



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΝΤΑΝΑΒΑΡΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙ-ΙΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΜΕΛΙΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ
ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ Α**

ΛΑΡΙΣΑ, 2021

Μελέτη της αντι-ϊικής δράσης ελληνικών μελιών έναντι του ιού της γρίπης Α
Study of the antiviral activity of Greek honeys against influenza virus A

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ):

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ:

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ:

Μέλος ΕΔΙΠ

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας-Ιολογίας, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μόσιαλου Δημητρίου, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την καθοδήγηση του, αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα.

Η πραγμάτωση της παρούσας εργασίας δε θα ήταν δυνατή χωρίς την πολύτιμη βοήθεια του μέλους ΕΔΙΠ Δημητρίου Τηλέμαχου και της υποψήφιας Διδάκτορος Μαρίας Δάσκου, στους οποίους οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την υπομονή τους και τις χρήσιμες συμβουλές που μου παρείχαν σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας αυτής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη φιλία τους, τη συνεργασία τους και τη βοήθεια που μου παρείχαν όταν τη χρειάστηκα.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την οικονομική, αλλά και την ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Ιστορική Αναδρομή	10
1.2 Το μέλι	10
1.2.1 Πως παράγεται το μέλι.....	11
1.3 Σύσταση μελιού	12
1.3.1 Σάκχαρα.....	12
1.3.2 Οργανικά οξέα.....	13
1.3.3 Ένζυμα	14
1.3.4 Πρωτεΐνες και αμινοξέα	15
1.3.5 Μέταλλα και ιχνοστοιχεία, τέφρα του μελιού	15
1.3.6 Μικροοργανισμοί	16
1.3.7 Φλαβονοειδή – Πολυφαινόλες	17
1.3.8 Νερό.....	17
1.4 Τα είδη του μελιού	18
1.4.1 Μέλι Πεύκου (<i>Pinus silvestris</i>).....	18
1.4.2 Μέλι Ελάτης (<i>Abies alba</i>)	19
1.4.3 Μέλι θυμαριού (<i>Thymus serpyllus</i>).....	19
1.4.4 Μέλι βαμβακιού (<i>Gossypium hirsutum</i>)	20
1.4.5 Μέλι καστανιάς (<i>Castanea sativa</i>)	20
1.4.6 Μέλι ερείκης (<i>Erica multipolyflora</i>).....	21
1.5 Μέλι Manuka.....	21
1.6 Ευεργετικές επιδράσεις του μελιού στον άνθρωπο	23
1.6.1 Θρεπτική αξία.....	24
1.6.2 Αντιμικροβιακή δράση	24
1.6.3 Αντι-ιική δράση	26
1.6.4 Αντιοξειδωτική δράση	27
1.6.5 Αντιφλεγμονώδης δράση	28
1.6.6 Γαστρεντερολογικό Σύστημα.....	28
1.6.7 Επούλωση πληγών	28
1.6.8 Καρδιαγγειακές παθήσεις.....	29
1.7 Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	30
1.7.1 Γεύση και άρωμα.....	30
1.7.2 Το χρώμα	31
1.7.3 Υγροσκοπικότητα.....	32
1.7.4 Κρυστάλλωση	32

1.7.5 Ηλεκτρική αγωγιμότητα	33
1.7.6 Ιξώδες	33
1.8 Οι ιοί της γρίπης (Influenza)	33
1.8.1 Ο ιός της γρίπης τύπου Α	34
1.8.2 Νέο πανδημικό στέλεχος της γρίπης Α (A(H1N1)pdm09)	35
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	38
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
3.1 Δείγματα μελιού	38
3.2 Μέλι Manuka	38
3.3 Πειραματικό στέλεχος	39
3.4 Κυταροκαλλιέργειες	39
3.5 Έλεγχος τοξικότητας των μελιών στα κύτταρα	40
3.6 Έλεγχος αντι-ιικής δράσης	41
3.7 Εκχύλιση γενετικού υλικού	42
3.8 Εκκινητές για τον ιό της γρίπης H1N1	42
3.9 Αντίστροφη μεταγραφή για τον ιό της γρίπης Α (H1N1)	43
3.10 Real time PCR	44
3.11 Υπολογισμός ανασταλτικής συγκέντρωσης 50% (IC ₅₀)	45
3.12 Υπολογισμός δείκτη επιλεκτικότητας (SI)	45
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
4.1 Αποτελέσματα τοξικότητας των δειγμάτων μελιού έναντι των κυττάρων MDCK	46
4.1.1 Τιμές CC ₅₀ των δειγμάτων	46
4.2 Αποτελέσματα αντι-ιικής δράσης των δειγμάτων μελιού έναντι του ιού της γρίπης A48	
4.2.1 Τιμές IC ₅₀ των δειγμάτων	48
4.2.2 Τιμές SI των δειγμάτων	49
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μέλι εδώ και χιλιάδες χρόνια εκτιμάται για τη διατροφική και θεραπευτική του αξία. Τα τελευταία χρόνια η δυναμική του μελιού ως προς την καταπολέμηση πολλών παθήσεων και παθογόνων μικροοργανισμών, το έχει επαναφέρει στο επίκεντρο της επιστημονικής κοινότητας με κλινικές και εργαστηριακές μελέτες. Διάφορες *in vitro* μελέτες στο παρελθόν πιστοποιούν την αντιμικροβιακή δράση του μελιού έναντι πολλών βακτηρίων, μυκήτων και ιών. Επίσης το μέλι εμφανίζει αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική και καρδιοπροστατευτική δράση, όπως και η εφαρμογή του σε ανοιχτές πληγές εμφανίζει μεγάλη αποτελεσματικότητα στην επούλωση τους.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δώδεκα (12) μέλια από διάφορες ελληνικές περιοχές και βοτανικές πηγές ως προς την τοξικότητα τους έναντι της κυτταρικής σειράς νεφρών σκύλου (Madin-Darby canine kidney cell line, MDCK) και ως προς την αντι-ική τους δράση έναντι του ιού της γρίπης Α (H1N1). Η δράση των ελληνικών μελιών συγκρίθηκε με αντίστοιχο δείγμα μονοανθικού μελιού Manuka με UMF24+, το οποίο έχει ελεγχθεί επισταμένα για τις αντιμικροβιακές του δράσεις και έχει χρησιμοποιηθεί σε πλήθος μελετών.

Η μέτρηση της τοξικότητας των δειγμάτων μελιού έναντι των κυττάρων MDCK πραγματοποιήθηκε μέσω του υπολογισμού της τιμής CC_{50} (Cytotoxic Concentration 50%). Στην μελέτη μας η τιμή CC_{50} υπολογίσθηκε με τη μέθοδο MTT. Για τον προσδιορισμό της αντι-ικής δυναμικής των δειγμάτων μας πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του ιικού RNA και αντίστροφη μεταγραφή για τη δημιουργία προς cDNA. Στη συνέχεια, για τον ακριβή προσδιορισμό της επίδρασης των δειγμάτων μελιού στη μεταβολή του αριθμού των ιικών αντιγράφων, έγινε μια συγκριτική ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (comparative Real-Time PCR). Με βάση τα αποτελέσματα της Real-time PCR υπολογίσθηκε η τιμή IC_{50} για την έκφραση της αντι-ικής δράσης, όπως και ο δείκτης επιλεκτικότητας (selectivity index, SI) για τη μέτρηση της αποτελεσματικότητας των δειγμάτων μελιού.

Στη μελέτη της τοξικότητας των δειγμάτων μελιού έναντι των κυττάρων MDCK, τα μέλια εξετάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις και βρέθηκε ότι εμφανίζουν μεγάλη τοξικότητα έναντι των κυττάρων MDCK όταν είναι σε συγκεντρώσεις 128, 64 και 32 mg/ml. Τα αποτελέσματα των μελιών όσον αφορά την αντι-ική δράση έναντι

του ιού της γρίπης Α (H1N1). έδειξαν πως δεν εμφανίζουν όλα τα δείγματα αντικές ικανότητες.

Για πρώτη φορά μελετάται η αντι-ική δράση ελληνικών μελιών σε σύγκριση με το μέλι Manuka, έναντι του ιού H1N1, καθώς και η τοξική επίδραση των μελιών αυτών στην κυτταρική σειρά MDCK. Η αντι-ική δυναμική του μελιού Manuka επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα εργασία, όμως αξιοσημείωτα είναι τα αποτελέσματα ορισμένων ελληνικών μελιών, τα οποία χρήζουν περαιτέρω έρευνας ώστε να αναδειχθούν πλήρως οι μοναδικές ιδιότητές τους.

Λέξεις κλειδιά: Μέλι, ελληνικά μέλια, manuka, αντι-ική δράση, ιός, ιός της γρίπης Α, MDCK.

ABSTRACT

For thousands of years, honey is praised for its nutritional and therapeutic properties. The antimicrobial and therapeutic potential to fight against many diseases and pathogenic microorganisms have had brought honey in the center of many clinical and laboratory studies the last years. More specifically, many *in vitro* studies in the past have established honeys' antimicrobial effect against many different bacteria, fungi and viruses. In addition, honey also displays anti-inflammatory, antioxidant and cardioprotective qualities, as well as, high efficiency in healing open wounds.

In the current study, we examined twelve (12) honey samples from different Greek areas and botanic sources in terms of their toxicity against the Madi-Darby canine kidney (MDCK) cell line and in terms of their antiviral effect against the H1N1 virus. We compared the effect of Greek honey samples with the unifloral honey Manuka (UMF24+), which has been extensively tested for its antimicrobial effect.

Honey toxicity against the MDCK cells was tested with the MTT method and presented as CC50 value. Furthermore, in order to determine the antiviral effect, viral RNA extraction and reverse transcription to cDNA has been performed. Comparative Real-Time PCR was implemented in order to define the exact delineation of honey samples in variation of virus replication. Based on Real-Time PCR results, we also calculated the IC₅₀ value for the embodiment of the antiviral effect, as well as the Selectivity Index (SI) to properly measure the efficiency of the honey samples.

Regarding cytotoxicity against MDCK cells, we examined various honey dilutions and we found that all samples exert high levels of toxicity against MDCK cells at 128, 64 and 32 mg/ml. The results of our honey samples showed that not has all of them exert an antiviral effect against the H1N1 virus and also that the antiviral effect in our honey samples is variable.

For the first time we examined the antiviral effect of Greek honeys in comparison with the Manuka honey against the H1N1 virus and the toxic effect of our honey samples in the MDCK cell line. In our study, we established the antiviral effect of the Manuka honey, as well as, the efficiency of some Greek honey samples, for which, more data are needed.

Key words: Honey, Greek honey, manuka, antiviral effect, virus, influenza A virus, MDCK.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

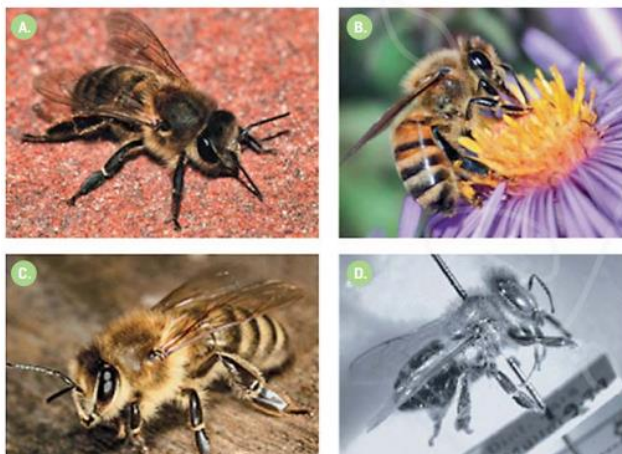
1.1 Ιστορική Αναδρομή

Το μέλι έχει χρησιμοποιηθεί ως τροφή και ιατρικό προϊόν από καταβολής κόσμου. Καθώς ήταν το μόνο διαθέσιμο φυσικό γλυκαντικό, το μέλι ήταν ένα σημαντικό φαγητό για τον *Homo sapiens* από την αρχή του. Πράγματι, η σχέση μεταξύ των μελισσών και του ανθρώπου ξεκίνησε ήδη από την λίθινη εποχή (Crane, 2013). Η πρώτη γραπτή αναφορά στο μέλι, ανιχνεύτηκε σε ένα δισκίο Σουμέριων που χρονολογείται από το 2100-2000 π.Χ., όπου αναφέρει τη χρήση του μελιού ως φάρμακο και αλοιφή (Crane, 1975). Στους περισσότερους αρχαίους πολιτισμούς το μέλι χρησιμοποιήθηκε τόσο για διατροφικούς όσο και για ιατρικούς σκοπούς (Allsop & Miller, 1996). Σύμφωνα με τη Βίβλο, ο Βασιλιάς Σολομών είπε: «Φάε μέλι γιέ μου, γιατί είναι καλό» (Παλαιά Διαθήκη, παροιμία 24:13). Η πεποίθηση ότι το μέλι είναι θρεπτικό συστατικό, φάρμακο και αλοιφή έχει συνεχιστεί μέχρι και σήμερα.

Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα στην ανθρώπινη ιστορία ήταν μια σημαντική πηγή υδατανθράκων και το μόνο ευρέως διαθέσιμο γλυκαντικό, έως ότου η παραγωγή βιομηχανικής ζάχαρης άρχισε να αναπτύσσεται και να το αντικαθιστά μετά το 1800 (Crane, 1975). Το μέλι επιπρόσθετα, έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές κουλτούρες για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες, όπως ως φάρμακο για εγκαύματα, καταρράκτη, έλκη και επούλωση πληγών, απλώς και μόνο επειδή έχει καταπραϋντικό αποτέλεσμα όταν αρχικά εφαρμόζεται σε ανοιχτές πληγές (Coulston, 2000).

1.2 Το μέλι

Οι θεραπευτικές ιδιότητες και η διατροφική αξία του μελιού αναμφίβολα αναγνωρίζεται εδώ και χιλιάδες χρόνια από τον άνθρωπο. Ως μέλι σύμφωνα την Ευρωπαϊκή οδηγία 2001/110/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου ορίζεται η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* (Εικόνα 1.2) από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομυζούντων φυτών ευρισκόμενα πάνω στα ζώντα μέρη των



Εικόνα 1.2: Κύρια ευρωπαϊκά υποείδη του *Apis mellifera* (Kmecl et al., 2014).

φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμειγνύοντας με ειδικές ύλες του σώματός τους, αποθέτουν, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν.

Επιπλέον έναν ουσιώδη και επιτυχημένο ορισμό του μελιού έχει διατυπώσει και ο E. F. Phillips (1930): «το μέλι είναι ένα αρωματικό, γλοιώδες, γλυκό υλικό που προέρχεται από το νέκταρ των φυτών, το οποίο μαζεύουν οι μέλισσες και το μεταβάλλουν για την τροφή τους σε ένα πυκνότερο υγρό, και τελικά το αποθηκεύουν στις κηρήθρες τους. Είναι όξινης αντίδρασης, ρευστό στην αρχική μορφή του, αλλά μεταβάλλεται σε κρυσταλλικό όταν μείνει πολύ καιρό».

1.2.1 Πως παράγεται το μέλι

Ένα από τα πιο βασικά συστατικά του μελιού είναι το νέκταρ από το οποίο παράγεται το μέλι νέκταρος και μελιτώματος και συλλέγεται μέσω μιας σωληνοειδούς προβοσκίδας. Οι μέλισσες παίρνουν το νέκταρ από τα άνθη, ενώ το μελίτωμα προέρχεται από τα παράσιτα των φυτών. Ο χυμός απορροφάτε από τα παράσιτα, και περνά από το πεπτικό τους σύστημα όπου σχηματίζεται το μελίτωμα, το οποίο χρησιμοποιείται για την κάλυψη των αναγκών τους. Το αχρείαστο περίσσειμα εξάγεται με μορφή σταγονιδίων, που οι μέλισσες απομυζούν από το σώμα των παρασίτων ή από τα φύλλα των φυτών όπου πέφτει το μελίτωμα (Δερματόπουλος, 1949).

Το νέκταρ αποτελείται κυρίως από νερό και περιέχει διαλυμένα σάκχαρα, κυρίως σακχαρόζη, σε ποσοστό που ποικίλλει από 25-70% (Olaitan et al., 2007). Μετά την συλλογή του νέκταρ οι μέλισσες επιστρέφουν στην κυψέλη όπου ξεκινάει η διαδικασία της παλινδρόμησης. Η χημική σύσταση του νέκταρος έχει αλλάξει καθώς εντός της προβοσκίδας η μέλισσα προσθέτει ένζυμα με την μορφή σάλιου από τους σιελογόνους και υποφαρυγγικούς αδένες. Η μέλισσα επιστρέφει στην κυψέλη, όπου μετά από μια διαδικασία παλινδρόμησης μεταξύ μελισσών το νέκταρ εναποτίθεται στα κελιά της κηρήθρας. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της εξάτμισης και η ενζυμική επεξεργασία, καθώς η περιεκτικότητα του νερού παραμένει υψηλή το οποίο αποτελεί επικίνδυνο παράγοντα για την ανάπτυξη ζυμομύκητα (Chen, 2019). Η προσθήκη ενζύμων αφυδατώνει τα φυσικά σάκχαρα του μελιού, τα οποία τροποποιούν και επηρεάζουν τη χημική σύνθεση και το pH του. Επιπρόσθετα, οι ινβερτάσες και τα πεπτικά οξέα υδρολύουν σακχαρόζη για να παραχθούν γλυκόζη και φρουκτόζη που είναι μονοσακχαρίτες και οι πιο βασικοί υδατάνθρακες του

μελιού. Η ινβερτάση είναι ένα ένζυμο που συντίθεται από το σώμα της μέλισσας και εκκρίνεται από τους υποφαρυγγικούς αδένες της (Crane, 1999).

1.3 Σύσταση μελιού

Το μέλι είναι ένα πυκνό, υπέρκορο υδατικό διάλυμα απλών και σύνθετων σακχάρων αλλά και μεγάλης ποικιλίας άλλων ουσιών. Το μέλι όντας φυσικό προϊόν δεν επιδέχεται επεξεργασία και διατηρείται σε κοινή θερμοκρασία. Διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τα συστατικά του μελιού ως προς τα τελικά ποσοστά συγκεντρώσεών τους στο τελικό προϊόν. Η φυτική πηγή από όπου τρέφονται οι μέλισσες, η τοποθεσία όπου εδρεύουν, καθώς και οι συνθήκες συγκομιδής και αποθήκευσης του μελιού είναι κάποιοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν τη σύστασή του. Σήμερα έχουν αναγνωριστεί περίπου 300 ποικιλίες μελιού με βασική διαφορά τους, το νέκταρ που συλλέγουν οι μέλισσες για την παρασκευή του (Ajibola et al., 2012). Παράλληλα, η μελέτη των συστατικών του μελιού, αποτελεί μια βιβλιοθήκη πληροφοριών όπου μπορούμε να αντλήσουμε χρήσιμες πληροφορίες για την ταυτότητα του, την ποιοτική ταξινόμησή του αλλά και παράγοντες που αυξάνουν ή μειώνουν την εμπορική του αξία, πάντα εναρμονισμένη με τις ρήτρες της τοπικής και Διεθνούς νομοθεσίας (Θρασυβούλου, 1990).

1.3.1 Σάκχαρα

Το μεγαλύτερο ποσοστό στο μέλι καταλαμβάνουν τα σάκχαρα το οποίο φτάνει περίπου στο 83% (Πίνακας 1.3.1). Έχουν βρεθεί τουλάχιστον 22 διαφορετικά σάκχαρα από αναλύσεις που έχουν γίνει στο παρελθόν. Τα σάκχαρα είναι οργανικές ενώσεις μικρού μέχρι μεγάλου μοριακού βάρους, αποτελούν δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και παρέχουν σημαντικό ποσοστό ενέργειας στους οργανισμούς. Η σύνθεση των σακχάρων που περιέχει το μέλι είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για τις φυσικοχημικές και θρεπτικές ιδιότητες του όπως η γλυκύτητα, η οσμωτική πίεση, το ιξώδες και η ενεργειακή του αξία (Machado De-Melo et al., 2018).

Υδατάνθρακες	Μέση περιεκτικότητα (%)	Διακύμανση (%)
Φρουκτόζη	39,3	21,7-53,9
Γλυκόζη	32,9	20,4-44,4
Φρουκτόζη/Γλυκόζη	1,19	1,06-1,21
Σουκρόζη	2,3	2,7-16

Μαλτόζη και άλλοι ολιγοσακχαρίτες	7,3	
Άλλα ανώτερα σάκχαρα	1,5	
Σύνολο	83,3	

Πίνακας 1.3.1: Οι κυριότεροι υδατάνθρακες του μελιού (Crane, 1990).

Η φρουκτόζη και η γλυκόζη είναι τα σάκχαρα που συναντάμε σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο μέλι. Αυτά τα σάκχαρα δεν υπάρχουν στο νέκταρ ή στα μελιτώματα φυτών αλλά προέρχονται από την ιμβερτοποίηση (υδρόλυση) της σουκρόζης (δισακχαρίτης) στον πρόλοβο των μελισσών. Η γλυκόζη εμφανίζει υψηλότερη διαλυτότητα από τη σουκρόζη στη θερμοκρασία κυψέλης και λόγω αυτού παράγεται ένα διάλυμα σακχάρων μεγαλύτερης συγκέντρωσης σε φρουκτόζη (Crane, 1990). Η σουκρόζη είναι το πιο βασικό σάκχαρο που περιέχεται στο νέκταρ και στα μελιτώματα φυτών και παράλληλα αποτελεί συστατικό του μελιού σε χαμηλή συγκέντρωση. Άλλοι δισακχαρίτες όπως η μαλτόζη και η μελεζιτόλη βρίσκονται με μεγαλύτερο ποσοστό στο μέλι. Επίσης στο μέλι περιέχονται οι ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι είναι μεσαίου μεγέθους σύνθετα σάκχαρα και περιέχουν πάνω από τρία απλά σάκχαρα, ενώ συχνά αποτελούνται από μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες. Γενικότερα τα μέλια νέκταρος είναι πλουσιότερα σε απλά σάκχαρα σε σχέση με τα μέλια μελιτώματος αλλά φτωχότερα σε δισακχαρίτες και ανώτερα σάκχαρα (Θρασυβούλου, 1990).

1.3.2 Οργανικά οξέα

Οργανικά οξέα ονομάζονται κάθε οργανική χημική ένωση με όξινες ιδιότητες. Στο μέλι περιέχονται περίπου 20 οργανικά οξέα και βρίσκονται σε συγκέντρωση περίπου στο 0,5% (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013). Τα οργανικά οξέα είναι κύριοι παράγοντες για την οξύτητα του μελιού, το οποίο μπορεί να είναι αρκετά γλυκό αλλά συμβάλλουν αρκετά στην διαμόρφωση της χαρακτηριστικής γεύσης του. Ένα από τα πιο σημαντικά οξέα που βρίσκονται στο μέλι είναι το γλυκονικό οξύ, το οποίο παράγεται από την δράση της οξειδάσης της γλυκόζης και προέρχεται από την γλυκόζη. Επιπρόσθετα κατά την αντίδραση αυτή, παράγεται και το υπεροξείδιο του υδρογόνου που μαζί με άλλες ενώσεις όπως κάποια καβοξυλικά οξέα είναι από τους κύριους παράγοντες της αντιβακτηριακής δράσης του μελιού. Τα οργανικά οξέα συμβάλλουν στο χαμηλό pH που επικρατεί στο μέλι με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση ανάπτυξης μικροοργανισμών (Dibner & Buttin, 2002). Επίσης στο μέλι έχουν

αναγνωριστεί και διάφορα μη αρωματικά οργανικά οξέα, το οξικό, το βουτυρικό το γαλακτικό είναι μερικά από αυτά (Machado De-Melo et al., 2018).

1.3.3 Ένζυμα

Ως ένζυμα ορίζονται πολύπλοκες πρωτεΐνες που σχηματίζονται μέσα στα ζωντανά κύτταρα και καταλύουν τις διάφορες αντιδράσεις. Στο μέλι τα ένζυμα βρίσκονται σε μικρές ποσότητες, με βασικότερα αυτών, την ιμπερτάση, την γλυκοξειδάση και την διαστάση με προέλευση από τους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών. Επίσης έχουν αναγνωριστεί και ένζυμα που προέρχονται από το νέκταρ και το μελίτωμα όπως η καταλάση, η οξική φωσφατάση και μία μικρή ποσότητα της διαστάσης. Στον Πίνακα 1.3.3 που ακολουθεί παρουσιάζεται ο ρόλος των σημαντικότερων ενζύμων.

Υποφαρυγγικοί αδένες	
Ιμπερτάση	Διασπά την σουρκόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη, είναι πιο θερμοευαίσθητη από την αμυλάση
Γλυκοξειδάση	Οξειδώνει τη γλυκόζη σε γλουκονικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία νερού, πιο θερμοευαίσθητη από την ιμπερτάση
Διαστάση (Αμυλάση)	Διασπά το άμυλο, θερμοευαίσθητη, δεν έχει βρεθεί ο ρόλος της στην παραγωγή μελιού-πιθανόν να βοηθά στην πέψη της γύρης από τις μέλισσες
Φυτική προέλευση (νέκταρ-μελιτώματα)	
Καταλάση	Ρυθμίζει τη δράση της γλυκοξειδάσης, με το να ελέγχει την ισορροπία του H ₂ O ₂
Οξική φωσφατάση	Υπάρχει στη γύρη, στο νέκταρ και το μέλι
Διαστάση (Αμυλάση)	Μία μικρή ποσότητα αυτής προέρχεται από τα φυτά

Πίνακας 1.3.3: Ο ρόλος των σημαντικότερων ενζύμων (Crane, 1990).

Τα ένζυμα είναι από τα πιο βασικά συστατικά του μελιού καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή του ώριμου μελιού από την πρώιμη μορφή του. Συμμετέχουν με καταλυτική παρουσία σε μια σειρά χημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν μεταξύ των συστατικών της τροφής της μέλισσας και των ουσιών που εκκρίνονται από αυτή. Όλες αυτές οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται από την πρώτη

στιγμή που η μέλισσα θα συλλέξει την τροφή της με το πρόβολο της, μέχρι και την στιγμή που το ώριμο μέλι πλέον, θα σφραγιστεί στις κερήθρες (Χαριζάνης, 1996).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα ένζυμα βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και μια αιτία αυτού, μπορεί να είναι η θερμική επεξεργασία που μπορεί να έχει δεχθεί το μέλι καθώς εμφανίζουν υψηλή θερμοευαισθησία. Όμως πρέπει πάντα να έχουμε υπόψιν ότι το μέλι μπορεί να έχει χαμηλό ενζυμικό δυναμικό εξ αρχής (Bosi & Battaglini, 1978).

1.3.4 Πρωτεΐνες και αμινοξέα

Στο μέλι οι ποσότητες των μη ενζυμικών πρωτεϊνών είναι μικρές και έχουν αναγνωριστεί περίπου 20 στον αριθμό, με το συνολικό τους ποσοστό να κυμαίνεται από 0,1 έως 0,5%. Η προέλευσή τους είναι φυτική με κύριες πηγές την γύρη, το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις των φυτών (Machado De-Melo et al., 2018). Οι περισσότερες πρωτεΐνες που περιέχονται στο μέλι είναι πεπτόνες, αλβουμίνες, γλοβουλίνες και νουκλεοπρωτεΐνες με κυριότερη την αλβουμίνη. Επίσης ανάλογα την προέλευση του μελιού συναντάμε και διαφορετικές πρωτεΐνες, με μόνο 4 πρωτεΐνες να είναι κοινή συνισταμένη στο κάθε είδος μελιού (Bosi & Battaglini, 1978).

Τα αμινοξέα αποτελούν υπομονάδες των πρωτεϊνών και έχουν αναγνωριστεί 26, με κύριο αμινοξύ την προλίνη η οποία αποτελεί το 50%-85% του συνόλου των αμινοξέων. Οι συγκεντρώσεις των αμινοξέων εξαρτώνται από την προέλευση του μελιού (νέκταρ ή μελίτωμα) (Hermosín et al., 2003). Επίσης διάφορα σημαντικά αμινοξέα που έχουν αναγνωριστεί στο μέλι είναι η φαινυλαλανίνη, το ασπαρτικό οξύ (+ασπαραγίνη) και το γλουταμινικό οξύ (+γλυκίνη) τα οποία είναι ελεύθερα αμινοξέα. Στα πρωτεϊνικά αμινοξέα αυτά που ξεχωρίζουν είναι το ασπαρτικό οξύ, το γλουταμινικό οξύ, η λευκίνη, η φαινυλαλανίνη, η βαλίνη και η ισολευκίνη (Bosi & Battaglini, 1978). Το προφίλ αμινοξέων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την αναγνώριση της βοτανικής προέλευσης ενός μελιού, ωστόσο αυτό είναι δύσκολο καθώς, ο προσδιορισμός της βοτανικής προέλευσης είναι μια δύσκολη διαδικασία που επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες (Shuel, 1975).

1.3.5 Μέταλλα και ιχνοστοιχεία, τέφρα του μελιού

Στο μέλι η ολική τέφρα βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Πιο συγκεκριμένα κυμαίνεται μεταξύ 0,1% με 0,3% στο μέλι ανθέων και περίπου στο 1% στο μέλι μελιτώματος (Machado De-Melo et al., 2018). Ως τέφρα (ash) ορίζουμε το μη πτητικό, ανόργανο υπόλειμμα του μελιού, έπειτα από καύση αυτού, το οποίο αποτελείται από

μέταλλα, μακροστοιχεία, ή ιχνοστοιχεία. Το έδαφος αποτελεί την πηγή των μετάλλων, καθώς τα φυτά τα προσλαμβάνουν από αυτό και τα μεταδίδουν στις μέλισσες μέσω του νέκταρος ή του μελιτώματος. Επίσης ένας παράγοντας του χρώματος του μελιού εκτός της βοτανικής προέλευσης είναι το ποσοστό των ανόργανων συστατικών που περιέχει. Τα ανοιχτόχρωμα μέλια συνήθως παρουσιάζουν χαμηλότερο ποσοστό σε ανόργανα συστατικά σε σχέση με τα σκουρόχρωμα μέλια(Πίνακας 1.3.5).

Μακροστοιχεία	Μ.ό. σε ανοιχτόχρωμα μέλια	Μ.ό. σε σκουρόχρωμα μέλια	Ιχνοστοιχεία	
Κάλιο	205	1679	Χρώμιο Λίθιο Νικέλιο Μόλυβδος Κασσίτερος Ψευδάργυρος Όσμιο Βηρύλλιο Βανάδιο Ζιρκόνιο	Άργυρος Βάριο Γάλλιο Βισμούθιο Χρυσός Γερμάνιο Στρόντιο
Χλώριο	52	113		
Θείο	58	100		
Νάτριο	18	76		
Ασβέστιο	49	51		
Φώσφορος	35	47		
Μαγνήσιο	19	35		
Σίδηρος	2,4	9,4		
Μαγγάνιο	0,3	4,1		
Χαλκός	0,3	0,6		
Πυρίτιο (σαν SiO ₂)	9	14		

Πίνακας 1.2.5: Τα ανόργανα στοιχεία σε ppm (Crane, 1990).

Το Κάλιο (K) αποτελεί το στοιχείο με τη μεγαλύτερη ποσότητα στο μέλι και μετά ακολουθούν το Θείο (S), το Χλώριο (Cl), το Ασβέστιο (Ca) και ο Φώσφορος (P). Επιπρόσθετα σε πολύ μικρές ποσότητες βρίσκονται τα υπόλοιπα ανόργανα στοιχεία στο μέλι. Φυσικά τα ποσοστά των ανόργανων στοιχείων διαφέρουν ανάλογα την φυτική προέλευση του μελιού(Crane, 1990).

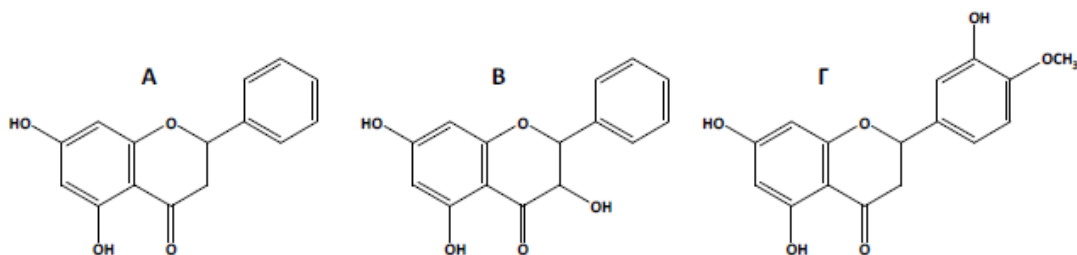
1.3.6 Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να επιβιώσουν στο μέλι παρά τις δυσμενείς συνθήκες που δημιουργούνται λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα, της οξύτητας αλλά και τις αντιμικροβιακές ουσίες που μπορεί να περιέχουν (Olaitan et al., 2007). Στο μέλι βρίσκονται κυρίως τα βακτήρια του γένους *Bacillus* και οσμοφυλικές ζύμες οι οποίες εμφανίζουν ανθεκτικότητα στις υψηλές συγκεντρώσεις των σακχάρων και οι περισσότερες ανήκουν στα γένη Νηματοσπόρα, Σακχαρομύκητες, Ζυγοσακχαρομύκητες, Σχίζοσακχαρομύκητες και Τορούλα.

Οι κύριες πηγές των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο μέλι είναι το νέκταρ, η γύρη αλλά και η μέλισσα, η οποία μπορεί να συνεισφέρει στην επιμόλυνση του μελιού με την μεταφορά μυκήτων από το σώμα της στο νέκταρ και τη γύρη που συλλέγει. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω παρά τις δυσμενείς συνθήκες που υπάρχουν στο μέλι μερικοί μικροοργανισμοί μπορεί να επιβιώσουν αλλά συνήθως σε ληθαργική κατάσταση. Οι μικροοργανισμοί που υπό συνθήκες μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια στον άνθρωπο είναι αυτοί που επιμολύνουν το μέλι κατά τη διάρκεια των μετασυλλεκτικών χειρισμών του (Χαριζάνης, 1996).

1.3.7 Φλαβονοειδή – Πολυφαινόλες

Φλαβονοειδή και πολυφαινόλες περιέχονται στο μέλι, τα οποία είναι σημαντικά βιοδραστικά στοιχεία και αποτελούν κύρια αιτία για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες (Samarghandian et al., 2017). Οι πηγές των φλαβονοειδών είναι η πρόπολη, η γύρη, το νέκταρ ή το μελίτωμα. Ένα σημαντικό φλαβονοειδές στο μέλι αποτελεί η πινοκεμπρίνη, η οποία βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα μέλια και προέρχεται από την πρόπολη. Επίσης σημαντικά φλαβονοειδή που βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα μέλια είναι η χρυσίνη, η γκαλανγκίνη και η πινομπανκσίνη (Σχήμα 1.3.7) (Tomas-Barberan et al., 2001).



Σχήμα 1.3.7: Χημική δομή της πινοκεμπρίνης (Α), πινομπανκσίνης (Β), και εσπερετίνης (Γ).

Επιπρόσθετα, υπάρχουν αναφορές στο παρελθόν πως τα σκουρόχρωμα μέλια περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό φαιολικών από ότι τα ανοιχτόχρωμα μέλια. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα σκουρόχρωμα μέλια εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013).

1.3.8 Νερό

Το νερό που βρίσκεται στο νέκταρ πριν τη διαδικασία ωρίμανσης είναι ανάλογο της φυσικής υγρασίας του μελιού. Το ποσοστό της φυσικής υγρασίας είναι σημαντικός παράγοντας γιατί καθορίζει την ανθεκτικότητα του μελιού στις ζυμώσεις. Το νερό στο μέλι κυμαίνεται από 13% ως 25% . Οι μέλισσες σφραγίζουν το μέλι στις κερήθρες

μετά τη διαδικασία της εξάτμισης όταν το ποσοστό της υγρασίας φτάσει το 15%-17%. Όπως υπάρχει το κατώτερο όριο περιεκτικότητας σε νερό για να διατηρούνται τα σάκχαρα εν διαλύσει, υπάρχει και το ανώτερο όριο 20% για την προστασία του μελιού από ζυμώσεις και έχει θεσπιστεί με την οδηγία 2001/110/EK του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου. Η υγρασία του μελιού επηρεάζει σημαντικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του αλλά και την <<συμπεριφορά>> του μετά τη συγκομιδή και την συσκευασία του μελιού (Χαριζάνης, 1996).

1.4 Τα είδη του μελιού

Η προέλευση του μελιού είναι από διαφορετικές φυτικές πηγές και παίρνει την ονομασία της επικρατέστερης πηγής κατά την εποχή της συλλογής του από τις μέλισσες όπως θυμαριού, πεύκου, ηλίανθου κλπ.

Το μέλι χωρίζεται σε δυο κατηγορίες:

- Μέλι ανθέων (ή νέκταρ): Παράγεται από το νέκταρ των φυτών.
- Μέλι μελιτωμάτων: Προέρχεται από εκκρίματα φυτών ή των εντόμων που απομυζούν τα φυτά.

Τα μέλια ανθέων και μελιτωμάτων μπορούν να προσδιοριστούν με βάση φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως η οξύτητα, το pH, η περιεκτικότητα σε προλίνη, το χρώμα, αλλά και η πτητική σύνθεση και το αντιοξειδωτικό δυναμικό καθώς διαφέρουν μεταξύ τους (Manyi-Loth et al., 2011). Επίσης, το μέλι ανθέων διακρίνεται σε δυο υποκατηγορίες ως προς την σύνθεση του. Το αμιγώς καθαρό ανθόμελο όπου θα πάρει τα χαρακτηριστικά (άρωμα, γεύση, χρώμα) της επικρατούσας ανθοφορίας και το μείγμα ανθόμελου που προκύπτει όταν στην περιοχή δεν υπάρχει επικρατούσα ανθοφορία (Θρασυβούλου, 2001). Το μέλι μελιτώματος παράγεται κυρίως από κωνοφόρα δέντρα και στην εγχωρία παραγωγή κατέχει ένα πολύ μεγάλο ποσοστό της τάξης του 70%-80%. Γενικότερα όμως, η χημική σύνθεση του μελιού ποικίλει από είδος σε είδος. (Θρασυβούλου, 1990).

1.4.1 Μέλι Πεύκου (*Pinus silvestris*)

Το πευκόμελο ηγείται στην ετήσια εγχώρια παραγωγή καθώς καταλαμβάνει το 65% της παραγωγής και προέρχεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellenica*, γνωστού ως «βαμβακάδα» ή «εργάτης» του πεύκου, το οποίο παρασιτεί το πεύκο. Στην Ελλάδα υπάρχουν δάση με πεύκα εμβολιασμένα με το έντομο *Marchalina hellenica* όπου παράγουν μεγάλες ποσότητες πευκόμελου. Αυτές οι περιοχές είναι κυρίως στην Εύβοια, Σκόπελο, Σκιάθο, Θάσο, Ζάκυνθο, Ρέθυμνο, Ρόδο

και Χαλκιδική. Το πευκόμελο σε σχέση με το ανθόμελο είναι πλουσιότερο σε πρωτεΐνες, αμινοξέα και ιχνοστοιχεία (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990). Επίσης χαμηλά επίπεδα γλυκόζης συναντάμε στο πευκόμελο με αποτέλεσμα η κρυστάλλωσή του να γίνεται με αργό ρυθμό. Επιπρόσθετα αξίζει να αναφέρουμε πως έχουν παρατηρηθεί διαφορές ως προς τα οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ανοιξιάτικου πευκόμελου σε σχέση με το φθινοπωρινό (Θρασυβούλου κ.ά., 2002).

1.4.2 Μέλι Ελάτης (*Abies alba*)

Το μέλι ελάτης είναι ένα μέλι εξαιρετικής ποιότητας και αποτελεί το 5%-10% της ελληνικής παραγωγής. Είναι και αυτό μέλι μελιτώματος καθώς προέρχεται από τις εκκρίσεις κοκκοειδών και αφίδων που παρασιτούν τα έλατα. Η ελάτη η Κεφαλληνική (*Abies cephalonica*) είναι το ελληνικό έλατο το οποίο βρίσκεται μόνο στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στην Ευρυτανία, τον Ταΰγετο, το Περούλι, την Πάρνηθα και άλλες περιοχές. Το μέλι ελάτης διακρίνεται για την ιδιαίτερα καλή του γεύση, είναι αρκετά πυκνόρρευστο και κρυσταλλώνει με βραδύ ρυθμό καθώς περιέχει χαμηλό ποσοστό σακχάρων. Το χρώμα του είναι συνήθως σκούρο αλλά ποικίλει ανάλογα την περιοχή. Επίσης υπάρχει και ένα άλλο είδος μελιού ελάτης όπως αυτό από την Βυτίνα, Αρκαδίας το οποίο ξεχωρίζει για την εμφάνιση του λόγω των χρυσών-μεταλλικών ανταυγείων στο χρώμα και ονομάζεται «έλατο βανίλια». Άξιο αναφοράς είναι το μέλι <<έλατο βανίλια>> του Μαινάλου καθώς είναι το μόνο ελληνικό μέλι που έχει χαρακτηριστεί ως Π.Ο.Π από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Απόφαση 313049 ΦΕΚ/Β 16.1.94). Το μέλι <<έλατο βανίλια>> του Μαινάλου είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία και περιέχει μικρή ποσότητα βιταμινών, η οποία βοηθάει στην καλύτερη αφομοίωση των σακχάρων από τον ανθρώπινο οργανισμό (Μπίκος, 1991).

1.4.3 Μέλι Θυμαριού (*Thymus serpyllus*)

Το θυμαρίσιο μέλι είναι ένα μέλι εξαιρετικής ποιότητας και κατέχει εξέχουσα θέση στις προτιμήσεις των καταναλωτών, λόγω του ότι είναι ένα έντονα αρωματικό μέλι με εξαιρετική γεύση. Το μέλι θυμαριού κατέχει το 10% της ελληνικής παραγωγής και οι κύριες περιοχές παραγωγής του είναι η Κρήτη, τα Κύθηρα, η Θεσσαλία, η Εύβοια και άλλες περιοχές. Υπάρχει ποικιλομορφία όσο αναφορά τη σύνθεση του ανάλογα την περιοχή αλλά συνήθως προέρχεται από ένα μείγμα βοτάνων *T. capitatus*, *Satureja thymbra*, *Origanum vulgare* και, σε μικρότερο βαθμό, *Thymus serpyllum* (Eleftheriou et al., 2009). Το συγκεκριμένο μέλι διαθέτει ένα χαρακτηριστικό ανοιχτό

κεχριμπαρένιο χρώμα και κρυσταλλώνει σε 6 έως 18 μήνες. Επίσης το θυμαρίσιο μέλι έχει τονωτικές και αντισηπτικές ιδιότητες και συμβάλει στην ενεργητικότητα του ανθρώπου (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

1.4.4 Μέλι βαμβακιού (*Gossypium hirsutum*)

Το μέλι από βαμβάκι καταλαμβάνει περίπου το 20% της εγχώριας παραγωγής (Alissandrakis et al., 2005). Αλλά η παραγωγή του έχει καθοδική τάση λόγω των ψεκασμών που δέχονται τα φυτά και από τις μικρές ποσότητες νέκταρος των νέων αυτογόνιμων καλλιεργειών. Η προέλευση του είναι από το άνθος του φυτού αλλά και από μελιτώδεις εκκρίσεις του φυτού. Το βαμβακόμελο που έχει προέλευση από μελίτωμα είναι ανοιχτόχρωμο και όταν κρυσταλλώσει γίνεται σχεδόν άχρωμο. Επίσης διακρίνεται για την υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα που διαθέτει και δεν έχει ιδιαίτερα καλή γεύση. Το μέλι βαμβακιού που έχει προέλευση από το άνθος του φυτού έχει και αυτό ανοιχτό χρώμα, όταν κρυσταλλώνει γίνεται γαλακτόχρωμο και η γεύση του είναι ιδιαίτερα βουτυρώδης. Γενικότερα το βαμβακόμελο είναι πλούσιο σε σάκχαρα και κρυσταλλώνει περίπου μετά από διάστημα 2 μηνών. Επιπρόσθετα διαθέτει υψηλή βακτηριοκτόνο δράση και είναι πλούσιο σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (Θρασυβούλου κ.ά., 2002).

1.4.5 Μέλι καστανιάς (*Castanea sativa*)

Το μέλι καστανιάς παράγεται σε ορεινά μέρη της Ελλάδας και η κύρια προέλευση του είναι η χερσόνησος του Αγίου Όρους. Είναι ένα ιδιαίτερο μέλι καθώς κατατάσσεται στα ανθόμελα αλλά παράγεται από το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της αφίδας *Myzocallis castanicola*, η οποία εγκαθίσταται στην κάτω επιφάνεια των φύλλων, αλλά και πάνω στα εχινόμορφα κύπελλα που περιβάλλουν τους καρπούς της καστανιάς. Το μέλι καστανιάς είναι έντονα αρωματικό και το χρώμα του κυμαίνεται από ανοιχτό καφέ μέχρι πολύ σκούρο καφέ ανάλογα την περιοχή προέλευσης του. Όσον αφορά τη γεύση, έχει μεγάλες εντάσεις και είναι ελαφρώς πικρή. Το καστανόμελο κρυσταλλώνει πολύ αργά, διαθέτει ανθεκτικότητα στη θέρμανση και είναι πλούσιο σε ιχνοστοιχεία όπως κάλιο, μαγγάνιο, μαγνήσιο, και βάριο. Επιπρόσθετα βοηθάει την κυκλοφορία του αίματος και δρα ως στυπτικό σε μερικές περιπτώσεις δυσεντερίας (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990). Το εγχώριο μέλι καστανιάς δεν διαφέρει σε φυσικοχημικά χαρακτηριστικά με τα ίδιου είδους μέλια άλλων χωρών (Accorti et al., 1986).

1.4.6 Μέλι ερείκης (*Erica multipolyflora*)

Το μέλι ερείκης είναι ένα μέλι με μεγάλη θρεπτική αξία και αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην ελληνική παραγωγή. Συναντάται σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Έχει την ιδιαιτερότητα να διακρίνεται σε 4 τύπους ανάλογα με το φυτό προέλευσης από την οικογένεια των Ερεικωδών:

- Φθινοπωρινή ερείκη ή «σουσουρά» (*Erica verticillata*)
- Ανοιξιιάτικη ερείκη (*Erica arborea*)
- Κουμαριά (*Arbutus unedo*)
- Ροδόδεντρο (*Rhododendron*)

Το φθινοπωρινό ερεικόμελο έχει κοκκινωπό χρώμα και διαθέτει χαρακτηριστική γεύση και άρωμα, πράγμα το οποίο του δίνει υψηλή θέση στις προτιμήσεις των καταναλωτών. Επίσης έχει μεγάλη φυσική περιεκτικότητα σε γλυκόζη και κρυσταλλώνει πολύ γρήγορα (1-3 μήνες). Παράλληλα το ανοιξιιάτικο μέλι ερείκης είναι πιο ανοιχτόχρωμο από το φθινοπωρινό και διαθέτει διαφορετική γεύση επίσης. Το μέλι κουμαριάς λειτουργεί ως τονωτικό για τα μελίσσια και λόγω της χαμηλής του εμπορικής αξίας συνήθως δεν μαζεύεται. Τέλος το μέλι ροδόδεντρου συναντάται κυρίως σε 3 είδη στην χώρα μας, η Αζαλέα, η Κάλμια και η Ασκληπιά (Θρασυβούλου κ.ά., 2002).

1.5 Μέλι Manuka

Το νέκταρ των ανθέων (Εικόνα 1.5) του δέντρου Manuka (*Leptospermum scoparium*) είναι η πηγή προέλευσης του μονοανθικού μελιού Manuka. Το Manuka είναι ένας θάμνος ή μικρό δέντρο της οικογένειας *Myrtaceae*, γηγενές στη Νέα Ζηλανδία και την ανατολική Αυστραλία. Το χρώμα του μελιού είναι σκούρο καφέ, έχει έντονη γεύση και άρωμα. Η εταιρία μελιού της Νέας Ζηλανδίας που το εμπορεύεται έχει χαρακτηρίσει το άρωμα του ως υγρό χρώμα και αρωματικό ενώ τη γεύση, μεταλλική και ελαφρώς πικρή. Το μέλι Manuka χρησιμοποιούταν συνέχεια στο



Εικόνα 1.5: Ανοιχτό άνθος του δέντρου Manuka (*Leptospermum scoparium*) (Clearwater, et al., 2018).

παρελθόν για τον καθαρισμό μολύνσεων, πληγών και εγκαυμάτων. Πλέον τις τελευταίες δεκαετίες εξετάζεται επισταμένα για τις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες (Alvarez Suarez et al., 2014).

Η βιολογική αξία του μελιού Manuka οδήγησε στο να αναλύεται κάθε παρτίδα του μελιού για την αντιβακτηριακή του δράση, η οποία διαφέρει μεταξύ των μελιών Manuka. Για τον λόγο αυτό, αναπτύχθηκε μια αξιόπιστη και σχολαστική μέθοδος για την μέτρηση της αντισηπτικής του ισχύς, με όνομα Unique Manuka Factor (UMF). Η κατηγοριοποίηση του μελιού για την αντιμικροβιακή του δύναμη γίνεται με βάση την μονάδα μέτρησης UMF. Ο αριθμός UMF έχει κλίμακα από το 0 ως το 25 και αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ενός διαλύματος φαινόλης που αποδίδει παρόμοια ζώνη αναστολής ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* με το υπό δοκιμή μέλι. Για παράδειγμα ένα διάλυμα φαινόλης 10% έχει την ίδια αντιβακτηριακή δραστηριότητα με ένα μέλι Manuka με UMF 10 (Allen et al., 1991).

Το μέλι Manuka έχει χαμηλή τιμή pH, υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και μεγάλη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, τα οποία είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες για τις αντιμικροβιακές του δράσεις. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως το μέλι Manuka διατηρεί την αντιμικροβιακή του δράση ακόμα και αν το μέλι είναι αραιωμένο ή έχει αδρανοποιηθεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Carter et al., 2016). Το 2008 ήταν η χρονιά όπου απαντήθηκε αυτό το ερώτημα καθώς ανακαλύφθηκε πως η μεθυλγλυοξάλη στα επίπεδα που βρίσκεται στο μέλι ήταν το πολυαναμενόμενο <<μη-υπεροξείδιο>> αντιβακτηριακό συστατικό (Adams et al., 2008).

Η μεθυλγλυοξάλη (MGO) προκύπτει από την άμεση αφυδάτωση της διωδροξυακετόνης (DHA), η οποία υπάρχει σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο νέκταρ των λουλουδιών του είδους *Leptospermum scoparium*. Η μετατροπή αυτή γίνεται μη ενζυμικά με έναν αργό ρυθμό κατά την διάρκεια της αποθήκευσής του μελιού Manuka. Μέχρι τώρα άγνωστο παραμένει πως η DHA σχηματίζεται στο νέκταρ των δέντρων Manuka αλλά και γιατί βρίσκεται σε τόσο μεγάλες ποσότητες. Επίσης η μεθυλγλυοξάλη βρίσκεται παρούσα και σε άλλα είδη μελιών αλλά και σε διάφορα τρόφιμα και ποτά. Γενικότερα η MGO σχηματίζεται από σάκχαρα κατά την διάρκεια παρατεταμένης αποθήκευσης ή θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων ή ποτών όπου υπάρχει παρουσία υδατανθράκων (Kwakman & Zaat, 2011).

Παρόλο την παραδοχή, πως το μέλι είναι πιο δραστικό όσο ψηλότερα είναι τα επίπεδα της MGO ή του υπεροξειδίου του υδρογόνου, αυτή η αναλογία δεν ισχύει

πάντα. Το γεγονός αυτό, μας δείχνει πως υπάρχουν και άλλα συστατικά στο μέλι που έχουν την ευθύνη για τις δράσεις του (Carter et al., 2016). Ένα από αυτά τα συστατικά είναι η αμυντοσίνη-1 (επίσης γνωστό και ως royalisin), η οποία είναι ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο που εκκρίνεται από τον υποφαρυγγικό αδένά των μελισσών οι οποίες χρησιμοποιούν τις εκκρίσεις του υποφαρυγγικού αδένά για την παραγωγή του βασιλικού πολτού και μελιού. Η αμυντοσίνη-1 έχει ισχυρή δραστηριότητα αλλά μόνο έναντι των Gram(+) βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων του *B.subtilis*, *S.aureus* και προνυμφών *Paenibacillus* (Kwakman & Zaat, 2011). Γενικότερα η αμυντοσίνη-1 και η μεθυλγλυοξάλη έχουν αναγνωριστεί ως οι κύριες αιτίες για την μη-υπεροξειδιακή δράση του μελιού (Machado De-Melo et al., 2018). Άλλα παράγοντες που συμβάλλουν στην αντιμικροβιακή του δράση είναι τα φαινολικά οξέα, η λυσοζύμη, τα φλαβονοειδή, οι πρωτεΐνες και τα ολιγοπεπτίδια (Cooper et al., 2002; Mundo et al., 2004).

Η αντιβακτηριακή δράση του μελιού Manuka δείχνει να είναι μεγαλύτερη έναντι των Gram (+) βακτηρίων σε σχέση με τα Gram (-) βακτήρια. Το μέλι Manuka δείχνει να έχει την ικανότητα να μπορεί να μεταβάλλει το σχήμα και το μέγεθος των βακτηρίων. Επίσης μελέτες έδειξαν ότι μπορεί να προκαλέσει απορρύθμιση της ανάπτυξης και μπορεί να επηρεάσει την κυτταρική διαίρεση σε βακτηριακά είδη *B. subtilis* και *S. Aureus* (Johnston et al., 2018). Όσον αφορά την αντιϊκή δράση του μελιού Manuka έχουν γίνει διάφορες αναφορές ότι παρουσιάζει ανασταλτική δράση έναντι του ιού varicella-zoster (ανεμοβλογιά, έρπητα ζωστήρα) και του ιού της γρίπη (Carter et al., 2016).

Τέλος στο μέλι Manuka έχει αναγνωριστεί η προστατευτική του δράση έναντι πολλών παθογόνων μικροοργανισμών. Επίσης το 2007 αποτελεί άλλη μια χρονιά ορόσημο για το μέλι Manuka καθώς εγκρίθηκε ως προτεινόμενη εναλλακτική θεραπεία για την ανακούφιση πληγών από την Ομοσπονδιακή Υπηρεσία Φαρμάκων των Η.Π.Α (Johnston et al., 2018).

1.6 Ευεργετικές επιδράσεις του μελιού στον άνθρωπο

Το μέλι ασκεί θετικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό τόσο με την διατροφική του αξία όσο και με τις ευεργετικές του ιδιότητες. Η συγκεκριμένη παραδοχή υπάρχει από αρχαιότατων χρόνων καθώς μεγάλοι πολιτισμοί όπως αυτοί των Μάγια, των Αιγυπτίων, των Ελλήνων και των Κινέζων φαίνεται να εκτιμούσαν την διατροφική του αξία αλλά και τις φαρμακευτικές του ιδιότητες (Samarghandian et al., 2017). Το μέλι

είναι σημαντικός παράγοντας στο <<ευ ζην>> του ανθρώπου και ενδείκνυται για καθημερινή χρήση ώστε οι θετικές επιδράσεις του να έχουν αντίκτυπο.

1.6.1 Θρεπτική αξία

Βάζοντας το μέλι στην καθημερινή μας διατροφή, δίνουμε στον οργανισμό μας μία ενεργειακή ώθηση, καθώς το μέλι αποτελεί σπουδαία πηγή ενέργειας. Η ενέργεια αυτή αντλείται από τους υδατάνθρακες που περιέχονται, που στην ουσία είναι απλά σάκχαρα τα οποία ο οργανισμός μας έχει την δυνατότητα να τα αφομοιώνει γρήγορα χωρίς να υπάρχει κάποια επιβάρυνση σε κάποιο όργανο του ανθρώπινου οργανισμού. Η γλυκόζη ουσιαστικά το βοηθάει να μετατραπεί σε ενέργεια σε μόλις 15 λεπτά, ώστε να βρεθεί στην κυκλοφορία του αίματος και να δώσει στον ανθρώπινο σώμα μια ενεργειακή ώθηση (Alvarez-Suarez et al., 2010). Το μέλι αποτελεί μια καλή τροφή για τους ανθρώπους αφού μπορεί να συμβάλει στην βελτίωση της υγείας ανθρώπων μεγάλης ηλικίας αλλά ακόμα και στην βελτίωση της απόδοσης των αθλητών (Machado De-Melo et al., 2018).

1.6.2 Αντιμικροβιακή δράση

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι αναγνωρισμένη εδώ και πολλά χρόνια. Το μέλι έχει τραβήξει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας λόγω της αντιμικροβιακής του ιδιότητας ως εναλλακτική θεραπεία. Οι 4 βασικοί παράγοντες αυτής της ιδιότητάς του είναι η υψηλή οσμωτικότητα, το χαμηλό pH, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και πολλοί φυτοχημικοί παράγοντες (Molan, 1992).

Η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων που περιέχει το μέλι είναι ένας από τους βασικούς πυλώνες της αντιμικροβιακής του δράσης. Το μέλι όντας ένα υπέρκορο υδατικό διάλυμα σακχάρων περιέχει περισσότερη ποσότητα σακχάρων από αυτές που μπορεί να έχει στην υγρή του φάση. Αυτό σημαίνει πως το μέλι περιέχει μικρές ποσότητες νερού πράγμα το οποίο αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξη βακτηρίων (Wang et al., 2012). Βέβαια υπάρχουν βακτήρια τα οποία δεν θέλουν μεγάλες ποσότητες για να αναπτυχθούν, οπότε η συμβολή της ώσμωσης στην ανάπτυξη των βακτηρίων είναι εξαρτώμενη με το είδος του βακτηρίου (Olaitan et al., 2007). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι πως αν τοποθετήσουμε μέλι πάνω σε μία πληγή, αυτό θα συμπεριφερθεί σαν σφουγγάρι και θα απορροφήσει όλο το νερό που υπάρχει. Αυτή είναι μια μορφή ωσμωτικού φαινομένου (Molan, 1992).

Το μέλι είναι όξινο καθώς το pH του κυμαίνεται μεταξύ 3,3 και 4,6 για το μέλι νέκταρος και 4,5 με 6,5 για το μέλι μελιτώματος. Αυτό συμβαίνει λόγω της παρουσίας

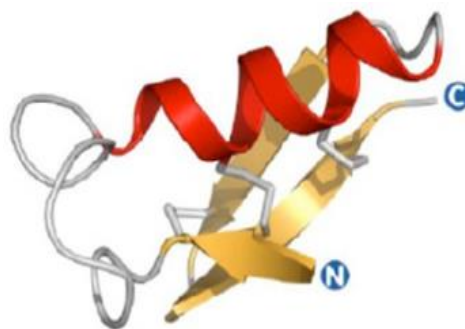
των οργανικών οξέων. Οι μέλισσες εκκρίνουν την οξειδάση της γλυκόζης, η οποία είναι το ένζυμο που καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ. Ανασταλτικός παράγοντας αποτελεί το χαμηλό pH του μελιού για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Molan, 1992). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα *E.coli*, *Salmonella* spp. και *P.aeruginosa* τα οποία χρειάζονται υψηλότερο pH από αυτό του μελιού για να μπορέσουν να αναπτυχθούν (Olaitan et al., 2007).

Ένας πολύ βασικός πυλώνας της αντιμικροβιακής δράσης του μελιού είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αποτελεί παραπροϊόν της βιοχημικής αντίδρασης όπου η γλυκόζη μετατρέπεται ενζυμικά σε γλυκονικό οξύ. Το H_2O_2 δεν έχει μόνο τη δυνατότητα να σταματάει την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλά μπορεί και να τα θανατώνει. Επίσης έχει αναγνωριστεί πως το H_2O_2 σε μικρές συγκεντρώσεις λειτουργεί ως αυξητικός παράγοντας στην επούλωση πληγών (Kwakman et al., 2010). Κάθε είδος μελιού περιέχει διαφορετική ποσότητα υπεροξείδιο του υδρογόνου το οποίο επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αντιμικροβιακή του δράση. Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την συγκέντρωση του H_2O_2 στο μέλι είναι η καταλάση, η οποία προέρχεται από τη γύρη και το νέκταρ (Mandal et al., 2011). Η καταλάση ως ένζυμο κατατάσσεται στις λειτουργικές πρωτεΐνες και δρα ως επιταχυντής της αντίδρασης της διάσπασης του υπεροξείδιο του υδρογόνου: $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$ (Weston, 2000). Επιπρόσθετα η εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορεί να προέλθει κατόπιν αντίδρασης του ασκορβικού οξέος και μεταλλικών ιόντων (Olaitan et al., 2007) ή κατόπιν θέρμανσης (Mandal et al., 2011).

Ως μη-υπεροξειδιακοί παράγοντες αναφέρονται πολλές φορές οι φυτοχημικοί παράγοντες του μελιού. Διάφορα είδη μελιού έχουν μη-υπεροξειδιακή αντιβακτηριακή δραστηριότητα. Οι φυτοχημικοί παράγοντες απαρτίζονται από τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τη λυσοζύμη, το αντιμικροβιακό πεπτίδιο bee defensin-1 και τη μεθυλγλυοξάλη (MGO) (Mandal et al., 2011). Το πιο γνωστό μέλι που φημίζεται για την μη-υπεροξειδιακή του δράση είναι το μέλι Manuka το οποίο παράγεται από το νέκταρ του δέντρου Manuka (*Leptospermum scoparium*), που είναι γηγενής στη Νέα Ζηλανδία. Ο σημαντικότερος παράγοντας στο μέλι Manuka που ευθύνεται για μη-υπεροξειδιακή δράση του είναι η μεθυλγλυοξάλη (MGO). Η MGO παράγεται στο Manuka από την μη ενζυμική μετατροπή της διϋδροξυακετόνης (DHA) η οποία βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο νέκταρ των λουλουδιών του είδους

Leptospermum scoparium (Kwakman et al., 2010). Σε διάφορα είδη μελιού έχει βρεθεί η μεθυλγλυοξάλη αλλά σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το μέλι Manuka (Machado De-Melo et al., 2018). Η μεθυλγλυοξάλη και διυδροξυακετόνη είναι υπεύθυνες για την καταστολή της ουρεάσης, την οποία χρησιμοποιούν τα βακτήρια για την παραγωγή της αμμωνίας μέσα στο όξινο περιβάλλον του μελιού ώστε να μπορέσουν να αναπτυχθούν. Επομένως και οι δύο έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στο μπλοκάρισμα της ανάπτυξης των βακτηρίων στο μέλι (Ahmed et al., 2018).

Ένα σημαντικό πεπτιδίο που συμβάλλει στην αντιμικροβιακή δραστηριότητα του μελιού είναι η αμυντοσίνη-1 (Εικόνα 1.6.2). Η αμυντοσίνη-1 (bee defensin-1) ανήκει στις αμυντίνες, μια ομάδα αντιμικροβιακών πεπτιδίων που είναι πλούσια σε κυστεΐνη. Το πεπτιδίο αυτό έχει βρεθεί στον αιμόλεμφο των μελισσών του είδους *hemolymphe* αλλά και στον βασιλικό πολτό (αναφέρεται ως <<royalisin>>). Στα Gram(+) βακτήρια είναι πολύ δραστική η αμυντοσίνη-1 συμπεριλαμβανομένων των *B.subtilis*, *S.aureus* και προνυμφών *Paenibacillus*. Ο



Εικόνα 1.6.2: Μοντέλο της αμυντίνης 1 από την *Apis mellifera* (Alvarez-Suarez et al., 2010).

υποφαρυγγικός αδένας των μελισσών είναι η πηγή από τον οποίο εκκρίνεται η αμυντοσίνη-1. Η ποσότητα της αμυντοσίνης-1 στον βασιλικό πολτό και στο μέλι ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό, ακόμα μπορεί να μην υπάρχει και καθόλου. Αυτό συμβαίνει διότι η έκφραση της αμυντοσίνης-1 στους υποφαρυγγικούς αδένες ή και η ποσότητα των εκκρίσεων του αδένα που προστίθενται, ποικίλουν έντονα (Kwakman & Zaat, 2011).

1.6.3 Αντι-ική δράση

Διάφορες in vitro μελέτες έχουν διεκπεραιωθεί στο παρελθόν για να αναδείξουν την αντι-ική δράση που μπορεί να έχει το μέλι έναντι ιών. Υπήρξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς την προστατευτική δράση του μελιού έναντι διαφορετικών τύπων ιών, όπως του ιού του απλού έρπητα (Al-Waili, 2004) και του ιού της Ερυθράς (Rubella) (Zeina et al., 1996). Επιπρόσθετα η προσθήκη μελιών Manuka και τριφυλλίου σε μολυσμένα από ιό έρπητα ζωστήρα ανθρώπινα κύτταρα κακοήθους μελανώματος (human malignant melanoma cells, MeWo) έδειξε μείωση των ιικών πλακών (Shahzad & Cohrs, 2012). Ακόμα ένα ενθαρρυντικό αποτέλεσμα είχαμε

επίσης, από μια μελέτη που εξέταζε την αντι-ικκή δράση διάφορων μελιών έναντι του ιού της γρίπης Α. Πιο συγκεκριμένα το μέλι Manuka που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι του ιού H1N1, αποδεικνύοντας έτσι την πιθανή αντι-ικκή δυναμική του (Watanabe et al., 2014).

Γενικότερα για την αντι-ικκή ιδιότητα του μελιού ευθύνονται διάφορα συστατικά όπως το ασκορβικό οξύ (βιτ. C), τα φλαβονοειδή και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Όλα αυτά τα συστατικά προκαλούν διακοπή της διαδικασίας μεταγραφής και μετάφρασης και αναστολή της ανάπτυξης του ιού. Επίσης το οξείδιο του νατρίου (NO), τα νιτρώδη και τα νιτρικά που προέρχονται από εκκρίσεις των σιελογόνων αδένων της μέλισσας επιβραδύνουν την ανάπτυξη ιογενών δερματικών αλλοιώσεων και διακόπτουν την ιική αντιγραφή μέσω παρεμβολής στις πρωτεΐνες και το γενετικό υλικό του ιού (Ahmed et al., 2018).

1.6.4 Αντιοξειδωτική δράση

Τα αντιοξειδωτικά δρουν εμποδίζοντας την οξείδωση των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες ή αποτρέποντας τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών. Τα μόρια με αντιοξειδωτική δράση είναι πολύ σημαντικά καθώς προστατεύουν την υγεία του ανθρώπου (Scalbert et al, 2005). Ειδικότερα, τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που λείπει και έτσι αποτρέπουν τη δράση τους ή ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα (Halliwell, 2005).

Οι κύριοι παράγοντες που προσφέρουν στο μέλι την αντιοξειδωτική του δράση είναι τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή. Αυτές οι ενώσεις δρουν συνεργατικά με τις μελανοϊδίνες, την οξειδάση της γλυκόζης, τα καροτενοειδή, την καταλάση, το ασκορβικό οξύ, τα οργανικά οξέα, τα αμινοξέα και τις πρωτεΐνες συνδιαμορφώνοντας την αντιοξειδωτική δυναμική του μελιού (Machado De-Melo et al., 2018). Υπάρχει μεγάλη συμβολή του μελιού μέσω της αντιοξειδωτικής του δράσης στην πρόληψη αρκετών οξειών και χρόνιων παθήσεων όπως οι φλεγμονώδεις διαταραχές (Süntar et al, 2010), οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Ajibola et al., 2012), ο διαβήτης (Erejuwa et al., 2010) και ο καρκίνος. Ειδικά στην περίπτωση του καρκίνου, τα αντιοξειδωτικά φέρεται να έχουν την πλήρη ευθύνη για την αντικαρκινική δράση του μελιού (Hassan et al., 2012).

1.6.5 Αντιφλεγμονώδης δράση

Κάθε πληγή που δημιουργείται είναι πιθανό και φυσιολογικό να εμφανίσει μία φλεγμονή η οποία αν παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να προκαλέσει διακοπή της διαδικασίας ίασης της πληγής αλλά και ισχυρότερα προβλήματα. Το μέλι παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση λόγω των φαινολικών συστατικών του (Burlando, 1978). Ειδικότερα το μέλι προκαλεί μείωση στα επίπεδα κιτοκινών, της *κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2)*, των *προσταγλανδινών* και της *κιτρικής συνθάσης (NOS)* που προκαλούν φλεγμονή με την επίδραση τους (Ahmed et al., 2018). Διάφορες μελέτες έδειξαν πως με την επάλειψη μελιού στις πληγές έχουμε υποχώρηση της φλεγμονής (Burlando, 1978).

1.6.6 Γαστρεντερολογικό Σύστημα

Το μέλι συμβάλει στην καλή λειτουργία και την υγεία του γαστρεντερικού συστήματος. Η θετικές επιδράσεις του μελιού στο γαστρεντερικό σύστημα απορρέουν κυρίως από την αντιερεθιστική, αναλγητική, αντιοξειδωτική και ανοσοποιητική δράση του. Η καθημερινή κατανάλωση μελιού μειώνει τον πληθυσμό των μικροβίων του εντέρου και βοηθάει στο έλκος στομάχου. Επίσης η συστηματική κατανάλωση μελιού συμβάλει στη μείωση της πιθανότητας υποτροπιασμού ενός ασθενή μετά από χειρουργείο σε κακοήθες κόλον ή καρκίνο της έδρας (Haffeejee & Moosa, 1985). Ακόμα το μέλι είναι η κατάλληλη γλυκαντική ουσία για συνδυασμό με τα γαλακτοκομικά προϊόντα καθώς δεν επιτρέπει την αύξηση βακτηρίων όπως *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus acidophilus*. Η υψηλή ποσότητα χολίνης που περιέχεται στο μέλι το καθιστά ως ένα από τα καλύτερα φυσικά καθαρτικά και έτσι συμβάλει στην καταπολέμηση της δυσκοιλιότητας (Hashem-Dabaghian et al., 2016).

1.6.7 Επούλωση πληγών

Το μέλι χρησιμοποιούταν από αρχαιοτάτων χρόνων για την επούλωση πληγών. Λόγω των ιδιοτήτων του, το μέλι έχει προστατευτική δράση και εξαιτίας της υψηλής οσμωτικότητάς που διαθέτει δημιουργεί ένα επουλωτικό υγρό για την πληγή το οποίο δεν κολλάει με τους τραυματισμένους ιστούς και δεν επιτρέπει τον αποικισμό βακτηρίων (Alvarez-Suarez et al., 2010). Ουσιαστικά τα βακτήρια και οι μύκητες δεν μπορούν να αναπτυχθούν καθώς τα δυο σάκχαρα (γλυκόζη και φρουκτόζη) που περιέχει συγκρατούν το νερό και ξεραίνουν την περιοχή της πληγής. Επιπρόσθετα η

αντιφλεγμονώδης δράση που παρουσιάζει δρα πιο γρήγορα από κλασικές θεραπείες με αποτέλεσμα την μείωση της φλεγμονής (Abdullah & Clemencia, 2009).

Το μέλι προωθεί την ανάπλαση του ιστού με τη διέγερση και τον πολλαπλασιασμό των μονοκυττάρων, των φαγοκυττάρων, των T- και B-λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων. Όπως επίσης και την έκκριση κυτοκινών όπως του TNF-α και των ιντερλευκινών -1β και -6. Όλες αυτές οι διαδικασίες έχουν ως στόχο να ξεκινήσουν και να επιταχύνουν την διαδικασία της επούλωσης της πληγής (Ahmed et al., 2018). Το μέλι έχει αναγνωριστεί πολλές φορές για την αποτελεσματικότητά του έναντι κλασικών θεραπειών με αντιβιοτικά και αντισηπτικά σε μετεγχειρητικές πληγές. Το μέλι δείχνει να είναι αποτελεσματικό ακόμα και σε τραύματα που έχουν μολυνθεί με τον ανθεκτικό στη μεθικυλλίνη *S. Aureus* (Mandal M. & Mandal S., 2011). Τέλος μπορούμε να πούμε πως οι βιταμίνες και τα αμινοξέα του μελιού χρησιμοποιούνται από την πληγή ως θρεπτικές ουσίες για την ανάπλαση του ιστού (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013).

1.6.8 Καρδιαγγειακές παθήσεις

Η συστηματική κατανάλωση μελιού βοηθάει σε καρδιαγγειακές παθήσεις και αυτό συμβαίνει λόγω της αποθήκευσης του γλυκογόνου στους μύες της καρδιάς και της ακετυλοχολίνης που περιέχεται στο μέλι. Όλα τα σάκχαρα του μελιού αλλά κυρίως η γλυκόζη, αποτελεί απαραίτητο συστατικό για τις συστολές του καρδιακού μυός και είναι πηγή ενέργειας για την καρδιά. Επιπρόσθετα, η ακετυλοχολίνη και τα σάκχαρα του μελιού συμβάλουν στην διαστολή αγγείων και στην μείωση της υπέρτασης. Γενικότερα οι αντιοξειδωτικές ουσίες που περιέχονται στο μέλι, συμβάλουν στην μείωση του κινδύνου για καρδιαγγειακές παθήσεις (Krell, 1996). Τα φαινολικά συστατικά του μελιού παρουσιάζουν αντιθρομβωτική, αντι-ισχαιμική, αγγειοδιασταλτική και αντιοξειδωτική δράση και δρουν προστατευτικά στην περίπτωση στεφανιαίας καρδιακής νόσου (Samarghandian et al., 2017). Διάφορες μελέτες έχουν γίνει στο παρελθόν όπως όταν η χορήγηση μελιού χρησιμοποιήθηκε ως θεραπεία σε ασθενείς με καρδιακές διαταραχές και έδειξε πως το 74% των ασθενών εμφάνισαν βελτίωση (Krell, 1996). Άλλη μια έρευνα έδειξε πως υπέρβαρα άτομα μετά από κατανάλωση 70 γραμμαρίων μελιού επί 30 μέρες εμφάνισαν χωρίς να αυξήσουν το σωματικό τους βάρος, μείωση της ολικής χοληστερόλης, της LDL χοληστερόλης, της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) και της τριακυλογλυκερόλης (Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013).

1.7 Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μελιού είναι άμεσα εξαρτώμενα από την γεωγραφική περιοχή και την βοτανική πηγή από την οποία παίρνουν το νέκταρ οι μέλισσες. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν σε μικρότερο βαθμό τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μελιού είναι οι κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή, η φυσιολογία της μέλισσας και η διατροφή της και η μετασυλλεκτική επεξεργασία του μελιού (Manyi-Loh et al., 2011). Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μελιού είναι:

- Η γεύση
- Το άρωμα
- Το χρώμα
- Η ρευστότητα

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αποτελούν μια χρήσιμη πηγή πληροφοριών για το μέλι. Ένα παράδειγμα είναι πως από το χρώμα του μελιού μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες για την βοτανική προέλευση του μελιού. Στο μέλι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την ποιότητά του και αποτελούν βασικό κριτήριο για τις προτιμήσεις των καταναλωτών ως προς ποιο είδος μελιού θα επιλέξουν (Θρασυβούλου & Μανίκης, 1990).

1.7.1 Γεύση και άρωμα

Η γεύση και το άρωμα του μελιού είναι από τα βασικά κριτήρια της ποιότητας του και εξαρτώνται από τα πτητικά συστατικά, τα σάκχαρα, τα οξέα, τα αμινοξέα και τις τανίνες που περιέχει (Machado De-Melo et al., 2018). Η γλυκιά γεύση που έχει το μέλι οφείλεται στη φρουκτόζη και γλυκόζη που περιέχει (Aparna & Rajalakshmi, 1999). Ιδιαίτερη ευαισθησία παρουσιάζει η γεύση και το άρωμα του μελιού στη θέρμανση και στην κακή συντήρηση. Μία λανθασμένη θερμική επεξεργασία αλλάζει τη γεύση και το άρωμα του μελιού καθώς επιδρά στα σάκχαρα, στα οξέα και στις πρωτεϊνικές ουσίες πέρα από την απώλεια των πτητικών αρωματικών ουσιών. Επίσης ένας σημαντικός στη γεύση και το άρωμα του μελιού είναι τα δοχεία και ο χώρος αποθήκευσης καθώς είναι πιθανό να επιδράσουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μελιού και να υποβαθμίσουν την ποιότητα του. Υπάρχουν κάποιες προϋποθέσεις που πρέπει να τηρούνται για την σωστή εκτίμηση της γεύσης ενός μελιού:

1. Το μέλι πρέπει να είναι ελεύθερο από ξένα αρώματα.

2. Δεν πρέπει να έχει όξινη ή άλλου είδους οσμή που σχετίζεται με τη ζύμωση.
3. Η γεύση του πρέπει να είναι καθαρή και να μην περιέχει δυσάρεστες γεύσεις που σχετίζονται με το νέκταρ από το οποίο προέρχεται το μέλι ή από υπερθέρμανση του μελιού.
4. Αν το μέλι είναι μονοανθικό θα πρέπει η γεύση του να είναι ξεκάθαρη και όμοια με μέλια του ίδιου είδους.

Συνεπώς ο μελισσοκόμος και ο τυποποιητής θα πρέπει να δίνει ιδιαίτερη σημασία ώστε να διατηρείται και να αναδεικνύεται η γεύση και το άρωμα του μελιού σωστά ώστε να μην υποβαθμίζεται η ποιότητα του (Anklam, 1998).

1.7.2 Το χρώμα

Το χρώμα του μελιού εξαρτάται κυρίως από την βοτανική προέλευσή του και η διαύγεια του από το ποσοστό αιωρούμενων σωματιδίων που περιέχονται στο μέλι, όπως η γύρη. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία χρωμάτων στο μέλι (Εικόνα 1.7.2), από άχρωμο και διαυγές μέχρι σκούρο κεχριμπαρένιο ή μαύρο (Olaitan et al., 2007). Οι καταναλωτές συνήθως καθορίζουν τις



Εικόνα 1.7.2: Χρωματικές αποχρώσεις μελιών.

προτιμήσεις τους σύμφωνα με το χρώμα. Ειδικότερα οι Έλληνες καταναλωτές επιλέγουν κυρίως τα ανοιχτόχρωμα μέλια παρόλο που τα σκουρόχρωμα μέλια έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και είναι πλούσια σε ιχνοστοιχεία (Thrasyvoulou & Manikis, 1995). Οι πολυφαινόλες, οι ξανθοφύλλες, τα καροτενοειδή και οι ανθοκυανίνες είναι οι πιο σημαντικές χρωστικές του μελιού και είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνες για το χρώμα του. Σε μικρότερο βαθμό επηρεάζουν το χρώμα του μελιού τα σάκχαρα, τα αμινοξέα και τα μεταλλικά στοιχεία χρώμα (Machado De-Melo et al., 2018). Ένα μέλι για να χαρακτηριστεί ποιοτικό θα πρέπει να διατηρήσει το τυπικό χρώμα της της φυτικής του προέλευσης. Τέλος λανθασμένοι μετασυλλεκτικοί χειρισμοί μπορούν να οδηγήσουν σε αλλοίωση του χρώματος. Όταν συμβαίνει κάτι τέτοιο το μέλι συνήθως σκουραίνει (Thrasyvoulou & Manikis, 1995).

1.7.3 Υγροσκοπικότητα

Το μέλι θεωρείται υγροσκοπικό καθώς απορροφά υγρασία από την ατμόσφαιρα σε ειδικές συνθήκες με αποτέλεσμα την αύξηση της υγρασίας του (Olaitan et al., 2007). Η φρουκτόζη θεωρείται η κύρια αιτία της υγροσκοπικής ιδιότητας του μελιού. Το ποσοστό της υγρασίας που περιέχετε στο μέλι παίζει σημαντικό ρόλο στην δομή και στα χαρακτηριστικά του μελιού. Οι τιμές της υγρασίας ποικίλει ανάμεσα στα μέλια διαφορετικής προέλευσης. Το εύρος του ποσοστού της υγρασίας κυμαίνεται από 13% και 25%, με το 17% να θεωρείται το καλύτερο ποσοστό% (Machado De-Melo et al., 2018). Επίσης τιμή ισορροπίας λέγεται μία τιμή υγρασίας όπου το μέλι ούτε χάνει αλλά ούτε απορροφά υγρασία. Όταν το μέλι διαθέτει υγρασία κάτω από 17% τότε υπάρχουν πολύ λιγότερες πιθανότητες ζύμωσης. Επιπρόσθετα η διαδικασία της κρυστάλλωσης επιταχύνεται όταν υπάρχει υψηλή τιμή περιεκτικότητας νερού στο μέλι (Πίκουλας, 1986).

1.7.4 Κρυστάλλωση

Η αστάθεια του μελιού δημιουργεί την τάση στο μέλι να καταβυθίζει την περίσσεια σακχάρων, καθώς περιέχει περισσότερα σάκχαρα από αυτά που μπορεί να διαθέτει και να συγκρατεί. Στην αρχή δημιουργούνται στα τοιχώματα και στον πυθμένα του δοχείου μικροί κρύσταλλοι γλυκόζης. Μετέπειτα προστίθενται κι άλλοι κρύσταλλοι μέχρι να δημιουργηθούν συσσωματώματα γλυκόζης (Manikis & Thrasinoulou, 2001). Η γλυκόζη σε σχέση με την φρουκτόζη είναι λιγότερο διαλυτή με αποτέλεσμα να διαχωρίζεται από το νερό, στην συνέχεια να κατακρημνίζεται και τέλος να κρυσταλλοποιείται (Machado De-Melo et al., 2018). Όλα τα είδη μελιών δεν έχουν τον ίδιο τρόπο κρυστάλλωσης. Υπάρχουν τρεις τρόποι κρυστάλλωσης που συμβαίνουν ανάλογα με το μέγεθος, την συμπεριφορά των κρυστάλλων και τις επιπτώσεις της κρυστάλλωσης στην ποιότητα και την εμφάνισή του μελιού:

- Ανομοιόμορφα. Χοντροί κρύσταλλοι δημιουργούνται στην μάζα του μελιού, οι οποίοι βυθίζονται στον πυθμένα του βάζου, διαμορφώνοντας έτσι μία άνιση κατανομή κρυστάλλων. Η υγρασία αυξάνεται στα επιφανειακά στρώματα με αποτέλεσμα το μέλι να υποστεί ζύμωση, να έχει όξινη γεύση και έχει απωθητική εμφάνιση.
- Ομοιόμορφα. Στην περίπτωση αυτή, δημιουργούνται μικροί κρύσταλλοι, οι οποίοι κατανέμονται ομοιόμορφα σε όλο το μέλι. Δεν υπάρχει κίνδυνος το μέλι να ξινίσει και η εμφάνιση του μελιού δεν είναι απωθητική.

- Λεπτοκρυστάλλωση. Το συγκεκριμένο είδος κρυστάλλωσης γίνεται τεχνητά, , αναμειγνύοντας μικρή ποσότητα κρυσταλλωμένου μελιού (10-20 g/Kg) με ρευστό. Το μέλι έχει κρεμώδη υφή και διατηρείται σε θερμοκρασία ψυγείου. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι γνωστή ως μέθοδος Dyce (Manikis & Thrasivoulou, 2001).

1.7.5 Ηλεκτρική αγωγιμότητα

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα ενός διαλύματος ορίζεται ως η μαθηματική έκφραση της δυνατότητας υδατικού διαλύματος να άγει το ηλεκτρικό ρεύμα. Στο μέλι η τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας εξαρτάται από τις ποσότητες μεταλλικών στοιχείων, ανόργανων ιόντων, οργανικών οξέων και πρωτεϊνών που περιέχει. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα σχετίζεται με τη βοτανική προέλευση του μελιού, λόγω αυτού μπορούμε να πούμε πως η ηλεκτρική αγωγιμότητα αποτελεί πληροφορία για τη βοτανική προέλευση του κάθε μελιού. Το 1964 ο Vowel παρατήρησε πως η τιμή ηλεκτρικής αγωγιμότητας είναι πολύ μεγαλύτερη στα μέλια μελιτώματος από τα μέλια νέκταρος. Επίσης, η τέφρα του μελιού είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ηλεκτρική αγωγιμότητα καθώς έχει παρατηρηθεί πως αυξάνει όταν αυξάνει και η τέφρα του μελιού (Anklam, 1998). Ο ευρωπαϊκός κανονισμός ορίζει πως τα μέλια ανθέων δεν πρέπει να έχουν ηλεκτρική αγωγιμότητα μεγαλύτερη από 0,8 mS/cm, ενώ τα μέλια μελιτωμάτων πρέπει να έχουν ηλεκτρική αγωγιμότητα μεγαλύτερη από 0,8 mS/cm (Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2001).

1.7.6 Ιξώδες

Η ρεολογική ικανότητα του μελιού είναι μεγάλη και επηρεάζεται ανάλογα το είδος του μελιού, τη σύστασή του και κυρίως από το ποσοστό υγρασίας του μελιού. Το ιξώδες του μελιού μειώνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του (Πίκουλας, 1986). Επίσης οι δεξτρίνες και οι πρωτεΐνες συμβάλουν στην αύξηση του ιξώδους (Machado De-Melo et al., 2018). Το ιξώδες του μελιού παίζει σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία, στην αποθήκευση και στην αισθητική ποιότητά του, καθώς μειώνει τη ροή του κατά τη διάρκεια των διαδικασιών εξαγωγής, άντλησης, διήθησης, μίξης και εμφιάλωσης (Πίκουλας, 1986).

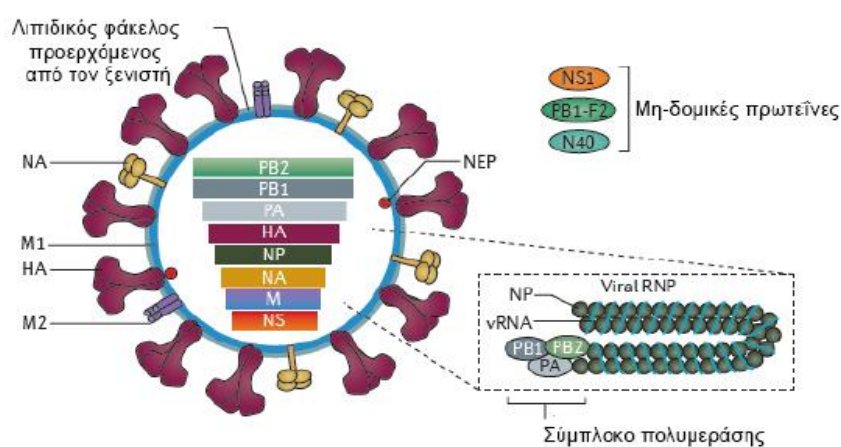
1.8 Οι ιοί της γρίπης (Influenza)

Οι ιοί της γρίπης (Influenza) ανήκουν στην οικογένεια Orthomyxoviridae (Ορθοβλεννοϊοί). Το όνομά της προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «ορθός» και «βλέννη», θέλοντας έτσι να δείξουν την ικανότητας των ιών της να προσκολλώνται

στη βλέννη (Αντωνιάδης κ.ά.,1999). Στην οικογένεια Orthomyxoviridae ανήκουν 5 γένη, αυτά των Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Thogotovirus και Isavirus. Οι Influenzavirus A, Influenzavirus B και Influenzavirus C έχουν υποταξινόμηση με βάση αντιγονικές διαφορές των μεμβρανικών πρωτεϊνών (M) και των νουκλεοπρωτεϊνών (NP) τους. Ο ιός της γρίπης A έχει διάφορους ξενιστές όπως άνθρωποι, χοίροι, άλογα, πτηνά, φάλαινες και φώκιες. Ο άνθρωπος θεωρείται μέχρι σήμερα ο μοναδικός ξενιστής του ιού της γρίπης B, ενώ ιός της γρίπης C περιλαμβάνει ως ξενιστές ανθρώπους και χοίρους (Potter, 2004).

1.8.1 Ο ιός της γρίπης τύπου A

Ο ιός της γρίπης A αποτελείται από οκτώ μονόκλωνα τμήματα γραμμικού RNA, τα οποία είναι αρνητικής πολικότητας. Κάθε μονόκλωνο τμήμα γραμμικού RNA είναι ξεχωριστά εγκλεισμένο σε σωματίδια ριβονουκλεοπρωτεΐνης (viral ribonucleoprotein, vRNP) με ένα αντίγραφο της ιικής RNA πολυμεράσης το οποίο αποτελείται από το ετεροτριμερές PB1:PB2:PA (polymerase basic 1 (PB1), polymerase basic 2 (PB2) and polymerase acidic (PA)), και πολλαπλά αντίγραφα νουκλεοπρωτεΐνης (nucleoprotein, NP) (Εικόνα 1.8.1)(Fodor, 2013).



Εικόνα 1.8.1: Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών και του γενετικού υλικού του ιού της γρίπης. Τροποποιημένο από (Medina & Garcia-Sastre, 2011).

Οι ιοί της γρίπης τύπου A με βάση τα επιφανειακά τους αντιγόνα, αιμοσυγκολλητίνη (HA) και νευραμινιδάση (NA) κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε υποτύπους. Οι υπότυποι αυτοί, έχουν διαφορές μεταξύ τους τουλάχιστον κατά 30% στην αλληλουχία των αμινοξέων (Potter, 2004). Ιδιαίτερης σημασίας για την επιδημιολογία της γρίπης και την παραγωγή εμβολίων είναι το γεγονός πως δεν υπάρχει διασταυρούμενη ανοσία μεταξύ των διαφορετικών υποτύπων (Τσακρής, 2009).

Η ΗΑ παίζει σημαντικό ρόλο γιατί καθορίζει τον τροπισμό του ξενιστή, καθώς δεσμεύεται σε υποδοχείς κυττάρων του ξενιστή οι οποίοι φέρουν στο άκρο τους α2,6 σιαλικό οξύ ή α2,3 σιαλικό οξύ (α2,6 sialic acid (α2,6 SA) ή α2,3 SA (α2,3 SA)). Επίσης, οι πρωτεάσες του ξενιστή επιδρούν σε μία θέση διάσπασης που διαθέτει. Η αμινοξική αλληλουχία που διαθέτει αυτή η θέση διάσπασης ρυθμίζει τον τροπισμό ως προς τους ιστούς και τη συστηματική εξάπλωση του ιού, επηρεάζοντας σε μεγάλο βαθμό τη δυναμική της προκαλούμενης νόσου.

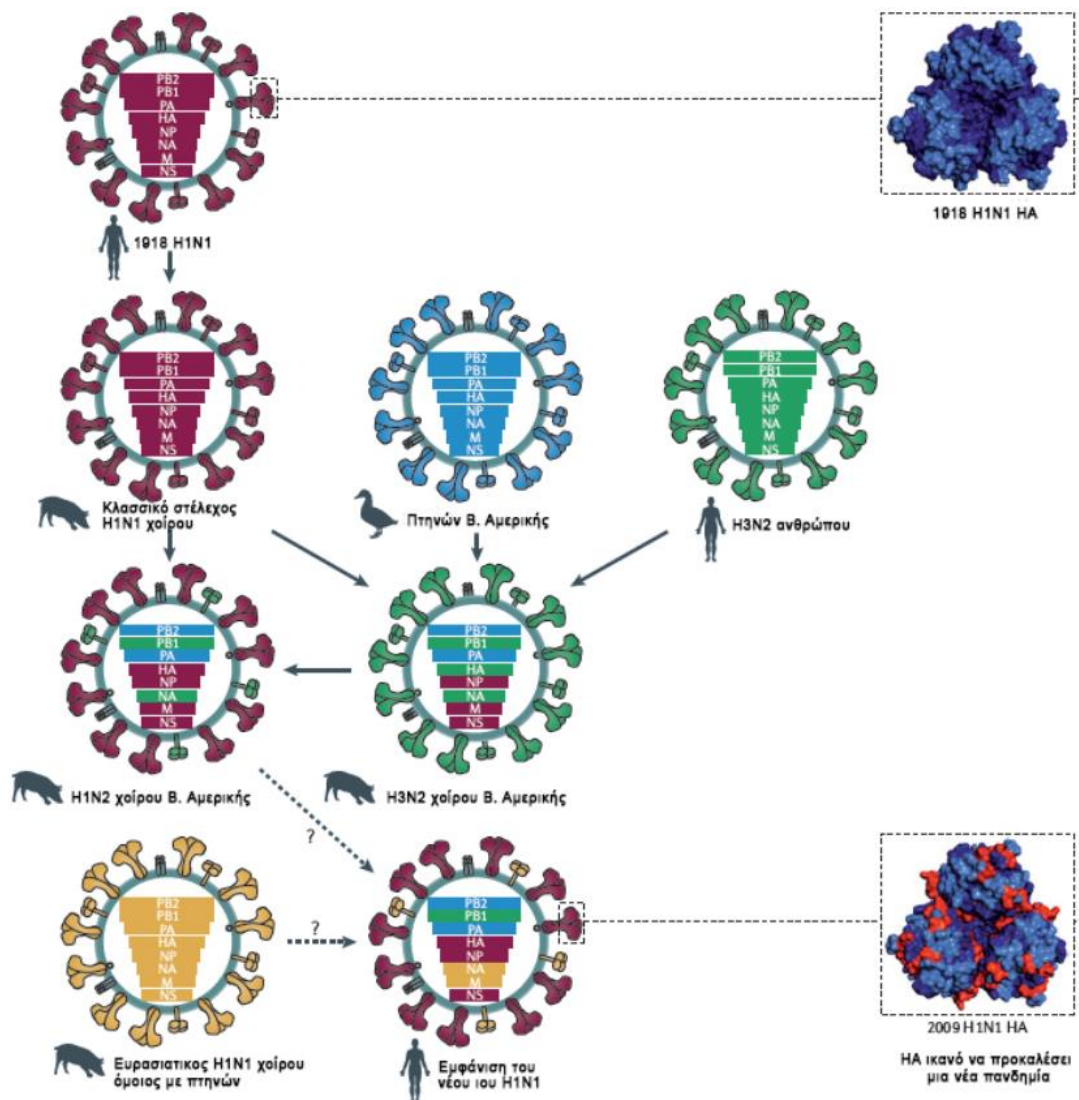
Η δραστηριότητα της ΝΑ είναι πολύ σημαντική στην καταστροφή των υποδοχέων σιαλικού οξέος (sialic acid, SA) των μεμβρανών, τόσο του ιού όσο και του ξενιστή. Για την απελευθέρωση των νέων ιών από τα μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη (Chatzopoulou et al., 2018).

Μέχρι στιγμής 16 διαφορετικά πρωτεϊνικά μόρια αιμοσυγκολλητίνης (ΗΑ) (H1, H2, H3, H4 κτλ.) και 9 νευραμινιδάσης (ΝΑ) (N1, N2, N3 κτλ.) έχουν αναγνωρισθεί, τα οποία δημιουργούν διάφορους συνδυασμούς μεταξύ τους με συνέπεια να ο κάθε συνδυασμός να αποτελεί έναν υπότυπο του ιού (Τσακρής, 2009). Από τον άνθρωπο έχουν απομονωθεί μόνο οι H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7 και H9N2 υπότυποι. Μεταξύ αυτών των υποτύπων πιο συχνά συναντάμε στον άνθρωπο τους H1N1, H2N2 και H3N2. Μέχρι το 1957 κυκλοφορούσε υπότυπος H1, με τον H2 να τον διαδέχεται μέχρι το 1968. Επίσης μέχρι σήμερα κυκλοφορούν οι H3,H1 με τον πρώτο να εμφανίστηκε το 1968 και τον δεύτερο να επανεμφανίστηκε το 1976. Ο υπότυπος H5 το 1997 εμφανίστηκε πρώτη φορά σε άνθρωπο, καθώς μέχρι τότε χρησιμοποιούσε πουλερικά ως ξενιστές. Επιπρόσθετα, στον υπότυπο νευραμινιδάσης N1 ανήκαν όλοι οι ιοί της γρίπης Α μέχρι το 1957 και το 1976 ο N1 επανεμφανίστηκε και διατηρείται μέχρι και σήμερα. Τέλος, στον N2 ανήκε ο ιός της γρίπης Α από το 1957 μέχρι και σήμερα (Kourti et al., 2012).

1.8.2 Νέο πανδημικό στέλεχος της γρίπης Α (A(H1N1)pdm09)

Ένας νέος H1N1 ιός εμφανίστηκε το 2009, από τον ιό της γρίπης των χοίρων. Ο νέος αυτός ιός γρίπης Α (A(H1N1)pdm09) προκάλεσε στον άνθρωπο την πρώτη πανδημία γρίπης του 21ου αιώνα. Ο νέος αυτός ιός εξαπλώθηκε σε 214 χώρες και προκάλεσε περισσότερους από 18.000 επιβεβαιωμένους θανάτους παγκοσμίως στον πρώτο χρόνο κυκλοφορίας του (Chatzopoulou et al., 2018). Γενετικές και εξελικτικές μελέτες έδειξαν ότι ο ιός A(H1N1)pdm09 έχει ένα πολύπλοκο σύνολο γονιδίων το οποίο έχει προέλευση από τους ιούς που χρησιμοποιούν ως ξενιστές τα πτηνά, τους ανθρώπους

και τους χοίρους. Ο ιός A(H1N1) επανεμφανίστηκε το 1977, με το 2009 ουσιαστικά να υπάρξει η αντιγονική εξέλιξή του. Η αντιγονική εξέλιξη του ιού οδήγησε σε οκτώ ενημερώσεις του συστατικού H1 του υπάρχον αντιγριπικού εμβολίου (Hay et al., 2001). Έναν νέο συνδυασμό γονιδιακών τμημάτων για τον οποίο δεν υπάρχουν αναφορές στο παρελθόν σε ιούς της γρίπης των χοίρων ή των ανθρώπων περιέχει ο A(H1N1)pdm09 ιός. Τα τμήματα των γονιδίων NA και M προέρχονται γενετικά από τους Ευρασιατικούς χοίρους (Maldonado et al., 2006), ενώ τα τμήματα των γονιδίων HA, NP και NS έχουν γενετική καταγωγή από την κλασική σειρά των χοίρων H1N1 τα οποία πιστεύεται ότι εισήλθαν στους χοίρους από την πανδημία του 1918. Τα τμήματα των γονιδίων HA, NP και NS κυκλοφορούν στους κλασικούς ιούς των χοίρων αλλά και στους τριπλά ανασυνδυασμένους (Olsen, 2002). Επίσης στους τριπλά ανασυνδυασμένους ιούς των χοίρων βρίσκονται τα PB2,PA και PB1 (Εικόνα 1.8.2) (Zhou et al., 1999).



Εικόνα 1.8.2: Αντιγονική προέλευση του πανδημικού στελέχους A(H1N1)pdm09. Τροποποιημένο από (Medina & García-Sastre, 2011).

Το γεγονός της αναδιάταξης της γρίπης των χοίρων μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως είναι πιθανό να έχουν υπάρξει και άλλοι αναδιαταγμένοι ιοί, που απλά δεν ανιχνεύτηκαν. Το ότι από τα χοιροειδή προέρχεται το πλησιέστερο προγονικό γονίδιο για καθένα από τα οκτώ γονιδιακά τμήματα υποδηλώνει πως ο ιός αυτός είναι πολύ πιθανό να κυκλοφορούσε σε κοπάδια χοίρων χωρίς να έχει ταυτοποιηθεί (Chatzopoulou et al., 2018).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η εξέταση δειγμάτων μελιού από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και διαφορετικές βοτανικές πηγές ως προς την αντι-ική τους δράση έναντι του ιού της γρίπης Α (H1N1) και, παράλληλα, ως προς την τοξικότητα τους έναντι της κυτταρικής σειράς Mardin-Darby Canine Kidney (MDCK, virucell, Microbiologist). Η δραστηριότητα των δώδεκα (12) υπό εξέταση δειγμάτων ελληνικού μελιού συγκρίθηκε με την αντίστοιχη δραστηριότητα δείγματος μονοανθικού μελιού Manuka, το οποίο έχει μελετηθεί επισταμένα για τις αντιμικροβιακές του δράσεις και έχει χρησιμοποιηθεί σε πλήθος μελετών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δείγματα μελιού

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν 12 δείγματα μελιού προερχόμενα από διαφορετικές βοτανικές πηγές και γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας έναντι του ιού της γρίπης Α (H1N1). Τα δείγματα μελιού μαζί με τη βοτανική τους ταυτότητα, καθώς και τη γεωγραφική περιοχή από την οποία προέρχονται παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 3.1.

Βοτανική Πηγή	Γεωγραφική Προέλευση
Πεύκο	Χαλκιδική
Πεύκο	Θάσος
Πεύκο	Ρόδος
Πεύκο	Ηράκλειο
Θυμάρι	Χανιά
Θυμάρι	Χίος
Θυμάρι	Κεφαλονιά
Θυμάρι	Κάλυμνος
Ερείκη	Άνδρος
Έλατο	Κορινθία
Βαμβάκι	Λάρισα
Καστανιά	Άγιο Όρος

Πίνακας 3.1: Βοτανική πηγή και γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων μελιού.

3.2 Μέλι Manuka

Το μέλι Manuka είναι της εταιρείας Steens™ και προέρχεται από το Βόρειο Νησί της Νέας Ζηλανδίας. Διαθέτει UMF24+ που αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα σε μεθυλγλυοξάλη τουλάχιστον 1122 mg/kg, από τις υψηλότερες τιμές που είναι διαθέσιμες στην αγορά. Η αντιμικροβιακή και αντι-ική δραστηριότητα αυτού του μελιού έχει διαπιστωθεί σε πλήθος μελετών, οπότε η αντι-ική δράση των δειγμάτων

μελιού που θα χρησιμοποιηθούν στην παρούσα μελέτη θα συγκριθεί με αυτή του Manuka.

3.3 Πειραματικό στέλεχος

Για το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε ταυτοποιημένο κλινικό στέλεχος H1N1, το οποίο προέρχεται από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αττικών (Δρ. Νικόλαος Σιαφάκας).

3.4 Κυταροκαλλιέργειες

Για τη μελέτη της αντι-ϊκής δράσης των μελιών έναντι του ιού της γρίπης η κυτταρική σειρά που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια του, ήταν η Mardin-Darby Canine Kidney (MDCK, vircell, Microbiologist). Τα MDCK κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό Minimum Essential Medium (MEM) με την προσθήκη 10% βόειου ορού (FBS) στους 37°C.

Καθημερινή ήταν η εξέταση των κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο διέλευσης φωτός, για να παρατηρηθεί η κάλυψη της επιφάνειας της πλαστικής φιάλης κυταροκαλλιιεργειών και η ποιότητά τους. Όταν το 90% της επιφάνειας της φιάλης καλυπτόταν από κύτταρα συνεχίζαμε με τον αναδιπλασιασμό των κυττάρων. Αρχικά αποβαλλόταν το θρεπτικό μέσο και έπειτα πραγματοποιούνταν 3 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα θρυψίνης – EDTA όπου στην τελευταία πλύση αφήνουμε την θρυψίνη για 2 λεπτά μέσα στην φιάλη προτού την απορρίψουμε. Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά στους 37°C ώστε να επιτευχθεί η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φιάλης. Στην συνέχεια τα αποκολλημένα κύτταρα επαναδιαλύονταν έπειτα σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης με παράλληλη ανάδευση με τη βοήθεια πιπέτας έτσι ώστε να διαλυθούν συσσωματώματα κυττάρων που πιθανόν να υπάρχουν. Το εναιώρημα των κυττάρων μοιραζόταν, τέλος, ισόποσα και τοποθετούνταν στους 37°C μέχρι τον επόμενο αναδιπλασιασμό. Ο αναδιπλασιασμός των κυττάρων πραγματοποιούνταν υπό άσηπτες συνθήκες, σε συσκευές καθέτου νηματικής ροής με επίπεδο βιοασφάλειας 2 και χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα υλικά.

Κατά τη διαδικασία της μόλυνσης με τον ιό της γρίπης στο θρεπτικό προστίθεται TPCK Trypsin συγκέντρωσης 3 µg/mL σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Eisfeld, Neumann, & Kawaoka, 2014). Επίσης η μόλυνση των κυττάρων με τον ιό της γρίπης έγινε υπό άσηπτες συνθήκες.

3.5 Έλεγχος τοξικότητας των μελιών στα κύτταρα

Τα 13 δείγματα μελιού που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη θα ελεγχθούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 και 1 mg/mL) ως προς την τοξικότητα τους στα MDCK. Ο έλεγχος της τοξικότητας πραγματοποιείται μέσω του υπολογισμού της τιμής CC_{50} (Cytotoxic Concentration 50%), η οποία χρησιμοποιείται ως μέτρο για την έκφραση του επιπέδου τοξικότητας και ορίζεται ως η συγκέντρωση μίας ουσίας η οποία θα θανατώσει το ήμισυ (50%) των κυττάρων σε μια μη μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια. Στην παρούσα ερευνητική μελέτη η τιμή CC_{50} υπολογίζεται με τη μέθοδο MTT (Denizot & Lang, 1986; Hansen, Nielsen, & Berg, 1989; Mossmann, 1983).

Αρχικά, τα κύτταρα επιστρώνονται σε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων με θρεπτικό υλικό MEM συγκέντρωσης 2% FBS και επωάζονται στους 37° C για μία ημέρα ώστε να καλύψουν επαρκώς την επιφάνεια της πλάκας. Κατά τη διαδικασία της επίστρωσης η στήλη 12 παραμένει κενή, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως τυφλό. Την επόμενη μέρα, εφόσον τα κύτταρα έχουν καλύψει επαρκώς την πλάκα, γίνονται οι αραιώσεις του μελιού σε θρεπτικό μέσο MEM χωρίς προσθήκη FBS, ώστε να επιτευχθούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις (128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 και 1 mg/mL) και να γίνει η επώαση. Πριν την επώαση με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε μελιού, το θρεπτικό υλικό της πλάκας απορρίπτεται. Κατά τη διαδικασία, η στήλη 11 συμπληρώνεται με θρεπτικό απουσία μελιού για να αποτελέσει το θετικό μάρτυρα της αντίδρασης, καθώς θα περιέχει μόνο ζωντανά κύτταρα. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, η πλάκα επωάζεται στους 37°C για μία ημέρα. Αφού περάσουν 24 ώρες, γίνεται προσθήκη 10 μ l MTT σε όλα τα πηγαδάκια της πλάκας και γίνεται επώαση στους 37° C για 1,5 ώρα ώστε στα ζωντανά κύτταρα να δημιουργηθούν κρύσταλλοι φορμαζάνης (formazan). Ακολουθεί προσθήκη 100 μ l διαλύματος SDS σε αραιό HCl 10mM, το οποίο διαλυτοποιεί τους κρυστάλλους που έχουν δημιουργηθεί στα ζωντανά κύτταρα και παράλληλα αναστέλλει την πιθανή επίδραση του δείκτη ερυθρό της φαινόλης που υπάρχει στο θρεπτικό προκαλώντας αλλαγή στο χρώμα του λόγω της μείωσης του pH. Κατά συνέπεια, όποια αλλαγή παρατηρείται στα πηγαδάκια οφείλεται στους κρυστάλλους φορμαζάνης και μπορεί να μετρηθεί με την απορρόφηση σε μήκος κύματος 570 nm. Από τις τιμές απορρόφησης που θα προκύψουν, υπολογίζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων για κάθε συγκέντρωση με τον τύπο:

%βιωσιμότητα

$$= \frac{\text{Μέση τιμή απορρόφησης για κάθε συγκέντρωση} - \text{Μέση τιμή απορρόφησης του τυφλού}}{\text{Μέση τιμή απορρόφησης θετικού μάρτυρα} - \text{Μέση τιμή απορρόφησης του τυφλού}}$$

Στη συνέχεια, δημιουργείται γραφική παράσταση με τις συγκεντρώσεις του μελιού που χρησιμοποιήθηκαν και των τιμών που προέκυψαν από την εφαρμογή του παραπάνω τύπου. Από την εξίσωση που προκύπτει από τη γραφική παράσταση, υπολογίζεται η συγκέντρωση του μελιού στην οποία παρατηρείται καταστροφή στο 50% των κυττάρων σε μια μη μολυσμένη με ιό κυτταροκαλλιέργεια. Η συγκέντρωση αυτή αποτελεί την κυτταροτοξική συγκέντρωση 50%, CC_{50} .

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
128mg/mL	A												
64mg/mL	B												
32mg/mL	C												
16mg/mL	D												
8mg/mL	E												
4mg/mL	F												
2mg/mL	G												
1mg/mL	H												

cc blank

Εικόνα 3.5: Ενδεικτική οργάνωση πλάκας μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

3.6 Έλεγχος αντι-ιικής δράσης

Για τον έλεγχο της αντι-ιικής δράσης των μελιών έναντι του ιού της γρίπης Α (H1N1) επιστρώθηκε πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων με κύτταρα MDCK στα οποία εκφράζεται ο κατάλληλος υποδοχέας (σιαλικό οξύ) για την είσοδο του ιού, σε θρεπτικό μέσο MEM 2% FBS. Οι πλάκες επώαστηκαν στους 37° C για 24 ώρες, μέχρι τα κύτταρα να καλύψουν το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του πλαστικού.

Την επόμενη μέρα, γίνεται δημιουργία αραιώσεων μελιού τελικής συγκέντρωσης (16,8,4,2 και 1 mg/mL) σε θρεπτικό μέσο MEM παρουσία ιού με ικό τίτλο κατάλληλο να προκαλέσει πλήρη καταστροφή στα κύτταρα μέσα σε 48 ώρες μετά τη μόλυνση. Γίνεται επώαση του θρεπτικού που περιέχει το μέλι, με τον ιό για 1 ώρα στους 37° C και στη συνέχεια γίνεται μόλυνση των κυττάρων. Η πλάκα

επώαζεται στον κλίβανο σε θερμοκρασία 37° C έως ότου παρουσιαστεί καταστροφή στον θετικό μάρτυρα (κύτταρα μολυσμένα με ιό χωρίς την παρουσία μελίου) και παρακολουθείται καθημερινά για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE. Μετά το τέλος της μέτρησης η πλάκα τοποθετείται στους -20° C και 24h μετά, τα δείγματα συλλέγονται σε tubes των 2ml έτσι ώστε να ακολουθήσει η διαδικασία της εκχύλισης του γενετικού υλικού.

3.7 Εκχύλιση γενετικού υλικού

Η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού και για τον ιό έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Casas (Casas, Powell, Klapper, & Cleator, 1995). Συγκεκριμένα, μέσα σε erpendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate. Επίσης προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (100 mg/ml) και τέλος 100μl δείγματος από τη φιάλη κυτταροκαλλιέργειας. Ακολούθησε ανάδευση του μείγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) και πραγματοποιήθηκε ξανά ανάδευση του μείγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Μετά την επώαση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 14000g και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση για τη διαλυτοποίηση του ιζήματος και ακόμη μία φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 14000g. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH₂O. Το RNA των δειγμάτων φυλάχθηκε στους -20oC για μελλοντική χρήση.

3.8 Εκκινητές για τον ιό της γρίπης H1N1

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του ιού της γρίπης σχεδιάστηκαν με βάση προηγούμενες μελέτες (Eisfeld et al., 2014) και στοχεύουν στο γονίδιο M του ιού, το οποίο είναι συντηρημένο ανάμεσα στους ιούς της γρίπης A. Η αλληλουχία τους και ο προσανατολισμός τους αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Προσανατολισμός
M30F2/08	ATG AGY CTT YTA ACC GAG GTC GAA ACG	sense
M264R3/08	TGG ACA AAN CGT CTA CGC TGC AG	antisense

Πίνακας 3.8: Αλληλουχίες των εκκινητών M30F2/08 και M264R3/08.

Να σημειωθεί ότι οι εκκινητές είναι εκφυλισμένοι και όπου Υ αναφέρεται σε C ή T και όπου N αναφέρεται σε οποιοδήποτε από τις 4 βάσεις A, C, T ή G.

3.9 Αντίστροφη μεταγραφή για τον ιό της γρίπης A (H1N1)

Ο ιός της γρίπης A (H1N1), έχει ως γονιδίωμα τεμαχισμένο μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας. Έτσι, για να μπορέσει να ακολουθήσει ανίχνευση των ιικών αντιγράφων του ιού στα δείγματα με Real-time PCR, το γονιδίωμα του ιού χρειάζεται να μετατραπεί στο συμπληρωματικό του cDNA. Η διαδικασία πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικού sense εκκινητή, ο οποίος στοχεύει σε τμήμα του γονιδίου-τεμαχίου M του ιού.

Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιείται σε μικροσωληνάρια των 0,5ml με τελικό όγκο αντίδρασης 20μl. Αρχικά, προετοιμάζεται το μίγμα 1 (M1) το οποίο περιείχε για κάθε αντίδραση:

- 5 pmol από τον sense εκκινητή
- 40 mM dNTPs
- 4 μl ddH₂O

Κατόπιν προστίθενται 7μl από το M1 και 5μl RNA (από την εκχύλιση) σε eppendorf των 0,5ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση και επώαση των δειγμάτων στους 65° C για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf - Mastercycler με σκοπό την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA.

Αμέσως μετά το πέρας των 5 λεπτών, τα δείγματα τοποθετούνται απευθείας στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα (M2).

Το M2 περιέχει για κάθε αντίδραση:

- 1X Fast Gene Buffer
- 0,01 mM DTT
- 100 U RT FastGene Scriptase II NIPPON Genetics
- 1,5 μl ddH₂O

Αφού προστίθενται 8μl από το M2 σε κάθε eppendorf πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων και έπειτα ακολουθούν δύο διαδοχικές επωάσεις στις παρακάτω συνθήκες: 42° C για 50 λεπτά (για τη σύνθεση του cDNA) και 70° C για 15 λεπτά (για την απενεργοποίηση του ενζύμου).

3.10 Real time PCR

Η Real-Time PCR επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του αρχικού υπό μελέτη δείγματος. Η ποσοτικοποίηση αυτή είναι δυνατή χρησιμοποιώντας μια χρωστική, στην παρούσα διατριβή την SYBR Green, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται σε δίκλωνο DNA φθορίζοντας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (520nm). Η μέτρηση του φθορισμού σε κάθε κύκλο οδηγεί στην κατασκευή ενός σχεδιαγράμματος (Amplification Plot), μέσω του οποίου υπολογίζεται το Ct (Cycle threshold), ο κύκλος δηλαδή στον οποίο υπερβαίνει την ουδό (threshold) η τιμή φθορισμού. Παράλληλα, χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων δημιουργείται μια πρότυπη καμπύλη αρχικών αντιγράφων σχετιζόμενα με την τιμή Ct, μέσω της οποίας υπολογίζεται η ποσότητα των αρχικών αντιγράφων του υπό μελέτη δείγματος. Για την μελέτη της εξειδίκευσης της μεθόδου χρησιμοποιείται το Melting Curve Analysis (ή Dissociation Curve) στο οποίο παρουσιάζεται ένα σχεδιάγραμμα μεταβολής φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία. Τμήματα ίσου μήκους με ίδια αλληλουχία εμφανίζουν μεταβολή στο φθορισμό στην ίδια θερμοκρασία, λόγω του Tm, ενώ η εμφάνιση μεταβολής φθορισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες υποδηλώνει την ύπαρξη παραπροϊόντων.

Πιο συγκεκριμένα δημιουργείται ένα μίγμα που περιέχει 1X Fast Gene Mix (Nippon Genetics), 10pmol από τον κάθε εκκινητή, 50nM ROX-Low και ddH₂O μέχρι τα 17μl. Το μίγμα αυτό προστίθεται σε ειδικά μικροσωληνάρια για Real-Time PCR των 0.2ml και προστέθηκαν 3μl από κάθε δείγμα. Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετούνται στον ειδικό για Real-Time PCR θερμοκυκλοποιητή PCR^{max} Eco_{TM} 48 (A Bibby Scientific Company) στις συνθήκες:

1 ^{ος} κύκλος	-2 min στους 95°C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλοι	-5 sec στους 95°C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 60°C για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση των κλώνων
1 ^{ος} κύκλος	- Ramping 55°C-95°C για τη δημιουργία του Melting Curve Analysis

3.11 Υπολογισμός ανασταλτικής συγκέντρωσης 50% (IC₅₀)

Η ανασταλτική συγκέντρωση 50% (inhibitory concentration 50%, IC₅₀) είναι μια τιμή που χρησιμοποιείται ως μέτρο της ισχύος μιας ουσίας στην αναστολή μίας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας. Ειδικότερα, η τιμή IC₅₀ ορίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί μείωση κατά το ήμισυ (50%) του ιικού τίτλου. Στην παρούσα εργασία η τιμή IC₅₀ χρησιμοποιείται για την έκφραση της αντι-ιικής δράσης των δειγμάτων μελιού έναντι του ιού της γρίπης Α. Υπολογίζεται με βάση τα αποτελέσματα της Real-time PCR σχετικά με την μεταβολή στον αριθμό των ιικών αντιγράφων συγκριτικά με το θετικό virus control. Για τον λόγο αυτό επιλέξαμε την συγκριτική μέθοδο Ct η οποία είναι επίσης γνωστή ως μέθοδος $2^{-\Delta\Delta Ct}$, χρησιμοποιώντας τον τύπο (Schmittgen & Livak 2008):

$$2^{-\Delta Ct} = Ct_{\text{κοντρόλ}} - Ct_{\text{δείγματος}}$$

3.12 Υπολογισμός δείκτη επιλεκτικότητας (SI)

Η παράμετρος που εκφράζει την αποτελεσματικότητα μιας ουσίας είναι ο δείκτης επιλεκτικότητας (selectivity index, SI), ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την αντι-ιική δράση των δειγμάτων μελιού. Ο δείκτης επιλεκτικότητας υπολογίζεται διαιρώντας την τιμή CC₅₀ της ουσίας προς την αντίστοιχη τιμή IC₅₀ (Cavalli et al., 2012). Επομένως, όσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης επιλεκτικότητας ενός δείγματος μελιού, τόσο μεγαλύτερη αντι-ιική δυναμική παρουσιάζει αναστέλλοντας την δράση του ιού σε μικρότερες συγκεντρώσεις από αυτές της κυτταροτοξικότητας.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτελέσματα τοξικότητας των δειγμάτων μελιού έναντι των κυττάρων MDCK

Δείγματα μελιού τα οποία δεν έχουν υποστεί κατεργασία, αραιώθηκαν σε θρεπτικό μέσο MEM και παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 και 1 mg/mL ώστε να παρατηρηθεί η τοξική τους δράση έναντι των κυττάρων MDCK. Ο έλεγχος της τοξικότητας πραγματοποιείται μέσω του υπολογισμού της τιμής CC_{50} (Cytotoxic Concentration 50%) η οποία υπολογίστηκε με την μέθοδο MTT (Denizot & Lang, 1986; Hansen, Nielsen, & Berg, 1989; Mossman, 1983). Επίσης θα πρέπει να αναφέρουμε πως κάθε δείγμα μελιού στην κάθε του συγκέντρωση προστίθεντο κάθε φορά σε πέντε πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης και επομένως, η τιμή CC_{50} που παρουσιάζεται είναι ο μέσος όρος από την κάθε πεντάδα.

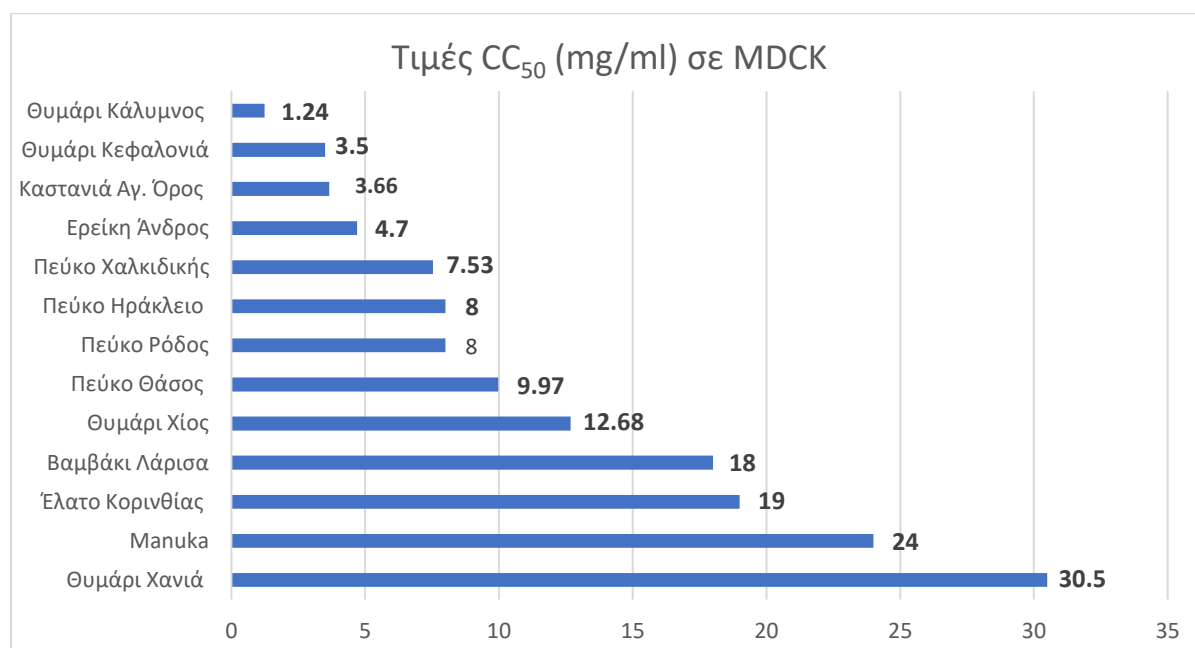
4.1.1 Τιμές CC_{50} των δειγμάτων

Μετά την πάροδο των διαδικασιών που αναφέραμε παραπάνω και εφαρμόζοντας την μέθοδο MTT τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον ακόλουθο Πίνακα 4.1.1.

Μέλι	CC_{50} σε MDCK	SD
Πεύκο Χαλκιδικής	7,53mg/mL	0,03783
Πεύκο Θάσος	9,97 mg/mL	0,04268
Πεύκο Ρόδος	8 mg/mL	0,10250
Πεύκο Ηράκλειο	8 mg/mL	0,07505
Έλατο Κορινθίας	19 mg/mL	0,06543
Βαμβάκι Λάρισα	18 mg/mL	0,05212
Θυμάρι Χανιά	30,5 mg/mL	0,12222
Θυμάρι Χίος	12,68 mg/mL	0,11183
Θυμάρι Κεφαλονιά	3,5 mg/mL	0,06100
Θυμάρι Κάλυμνος	1,24 mg/mL	0,04096
Ερείκη Άνδρος	4,7 mg/mL	0,08558
Καστανιά Αγ. Όρος	3,66 mg/mL	0,07390
Manuka	24 mg/mL	0,04035

Πίνακας 4.1.1: Οι τιμές CC_{50} των δειγμάτων μελιού και η τυπική απόκλιση (SD).

Το πρώτο εύκολο συμπέρασμα που μπορούμε να βγάλουμε είναι πως όλα τα δείγματα μελιού εμφανίζουν μεγάλη τοξικότητα έναντι των κυττάρων MDCK όταν είναι σε συγκεντρώσεις 128, 64 και 32 mg/ml. Στον παρακάτω Διάγραμμα 4.1.1 ακολουθούν οι τιμές CC_{50} των δειγμάτων μελιού σε αύξουσα σειρά.



Διάγραμμα 4.1.1: Τιμές CC_{50} των δειγμάτων μελιού σε αύξουσα σειρά.

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε ότι το Θυμαρίσιο μέλι Καλύμνου εμφανίζει την μεγαλύτερη τοξικότητα έναντι των κυττάρων MDCK με CC_{50} 1,24 mg/ml ακολουθούμενο από ένα ακόμα μέλι από θυμαρί αλλά αυτή την φορά από την Κεφαλονιά με τιμή CC_{50} 3,5 mg/ml. Επίσης αξίζει να αναφέρουμε πως όλα τα εξεταζόμενα μέλια από πεύκο από τις περιοχές τις Χαλκιδικής, Ηράκλειο, Ρόδος και Θάσος παρουσίασαν παρόμοιες τιμές CC_{50} και μάλιστα τα πευκόμελα από το Ηράκλειο και την Ρόδο παρουσίασαν την ίδια τιμή CC_{50} 8 mg/ml. Το μέλι από θυμαρί Χανίων είχε την μικρότερη τοξικότητα στο σύνολο των 13 μελιών που εκλέχθηκαν έναντι των κυττάρων MDCK καθώς η τιμή CC_{50} ήταν 30,5 mg/ml. Επιπρόσθετα την μεγαλύτερη διακύμανση στην τοξικότητα έναντι των κυττάρων MDCK παρατηρούμε πως είχαν τα μέλια από θυμαρί, καθώς κατείχαν την μικρότερη τιμή CC_{50} (1,24 mg/ml) αλλά και την μεγαλύτερη τιμή CC_{50} (30,5 mg/ml). Τέλος το μέλι Manuka που εξετάσαμε κατέλαβε την προτελευταία θέση στην κατάταξη της τοξικότητας με τιμή CC_{50} 24 mg/ml.

4.2 Αποτελέσματα αντι-ιικής δράσης των δειγμάτων μελιού έναντι του ιού της γρίπης Α

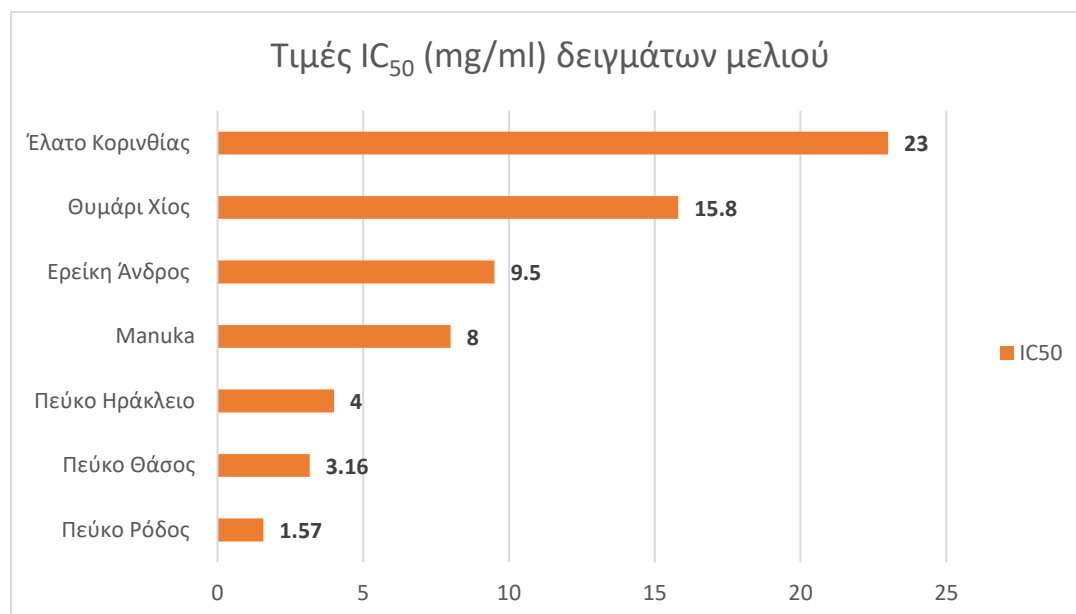
Για τον έλεγχο της αντι-ιικής δράσης των μελιών έναντι του ιού της γρίπης Α (H1N1) μετά από 24 ώρες από την επίστρωση της πλάκας κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων με κύτταρα MDCK προσθέσαμε τα δείγματα μελιού αραιωμένα στις τελικές συγκεντρώσεις (16,8,4,2 και 1 mg/mL) με θρεπτικό μέσο MEM παρουσία ιού με ιικό τίτλο κατάλληλο να προκαλέσει πλήρη καταστροφή στα κύτταρα μέσα σε 48 ώρες μετά τη μόλυνση. Μετά την καθημερινή παρακολούθηση της πλάκας για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE πραγματοποιήθηκε συγκριτική Real-Time PCR με σκοπό την ακριβή ποσοτικοποίηση των ιικών αντιγράφων και τον μετέπειτα υπολογισμό των τιμών IC_{50} και S.I.

4.2.1 Τιμές IC_{50} των δειγμάτων

Όπως αναφέραμε και παραπάνω η τιμή IC_{50} υπολογίζεται με βάση τα αποτελέσματα της Real-time PCR σχετικά με την μεταβολή στον αριθμό των ιικών αντιγράφων συγκριτικά με το θετικό virus control και με τη χρήση της συγκριτικής μεθόδου Ct, η οποία είναι επίσης γνωστή ως μέθοδος $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen & Livak 2008).

Αρχικά μετά την παρατήρηση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE στα δείγματα με μέλι από βαμβάκι Λάρισας, θυμάρι Χανίων, θυμάρι Καλύμνου, θυμάρι Κεφαλλονιάς, καστανιά Αγίου Όρους και πεύκο Χαλκιδικής σε όλες τις συγκεντρώσεις, ήρθαν και τα αποτελέσματα της Real-Time PCR και την εφαρμογή του τύπου Ct να επιβεβαιώσουν την οπτική μας παρατήρηση. Τα συγκεκριμένα δείγματα μελιού δεν είχαν τιμή IC_{50} καθώς σε όλα τα πηγαδάκια και σε όλες τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων μελιού, προκλήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό καταστροφής από το 50% των κυττάρων MDCK. Επομένως τα δείγματα μελιού από βαμβάκι Λάρισας, θυμάρι Χανίων, θυμάρι Καλύμνου, θυμάρι Κεφαλλονιάς, καστανιά Αγίου Όρους και πεύκο Χαλκιδικής δεν φάνηκε να έχουν αντι-ιική δράση έναντι του H1N1.

Στο Διάγραμμα 4.2.1 παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50} όλων των δειγμάτων μελιού εκφρασμένες σε mg/ml.



Διάγραμμα 4.2.1: Τιμές IC_{50} (mg/ml) των δειγμάτων μελιού κατά φθίνουσα σειρά.

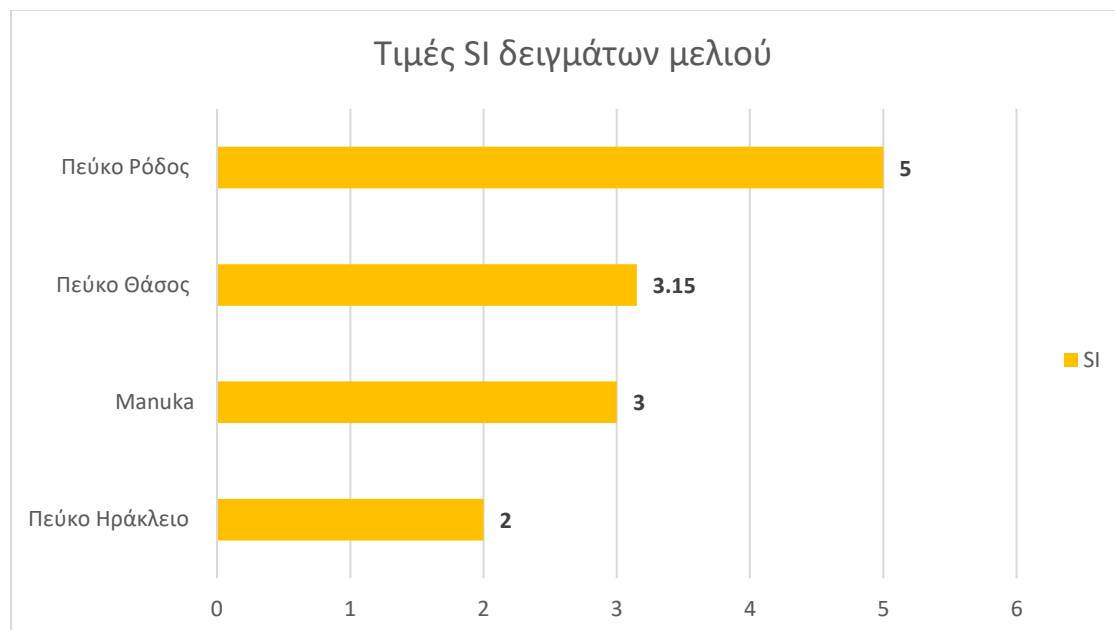
Με βάση τα αποτελέσματα των τιμών IC_{50} που πήραμε, συμπεραίνουμε ότι το μέλι από πεύκο Ρόδου έχει την μικρότερη τιμή IC_{50} και μειώνει τον ιικό τίτλο κατά το ήμισυ σε συγκέντρωση μόλις 1,57 mg/ml. Ακολουθεί το μέλι από πεύκο Θάσου με τιμή IC_{50} 3,16 mg/ml με αμέσως επόμενο το μέλι από πεύκο Ηρακλείου με τιμή IC_{50} 4 mg/ml. Την μεγαλύτερη τιμή IC_{50} με 23 mg/ml σημείωσε το μέλι από έλατο Κορινθίας, γεγονός που υποδεικνύει μειωμένη ικανότητα αναστολής του ιού συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Το δείγμα μελιού Manuka που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη παρουσίασε τιμή IC_{50} 8 mg/ml.

4.2.2 Τιμές SI των δειγμάτων

Η τιμή του δείκτη επιλεκτικότητας είναι πολύ σημαντική καθώς παρέχει ένα πιο ασφαλές συμπέρασμα για το αν η παρατηρούμενη μείωση των ιικών αντιγράφων οφείλεται σε τοξική επίδραση του μελιού στα κύτταρα - ξενιστές του ιού, ή σε απευθείας ανασταλτική επίδραση του στον ιό. Για κάθε δείγμα μελιού η τιμή του δείκτη επιλεκτικότητας (Selectivity index, SI) υπολογίζεται από την διαίρεση της τιμής CC_{50} του δείγματος προς την αντίστοιχη τιμή IC_{50} .

Στο διάγραμμα που ακολουθεί δεν μετρήθηκε και δεν παρουσιάζεται ο δείκτης επιλεκτικότητας των δειγμάτων μελιού που δεν είχαν τιμή IC_{50} αλλά και των δειγμάτων μελιού από έλατο Κορινθίας, θυμαρί Χίου και ερείκη Άνδρου. Τα τρία

αυτά δείγματα είχαν δείκτη επιλεκτικότητας SI υπό της μονάδας (<1), γεγονός που σημαίνει πως εμφανίζουν μεγαλύτερη τοξικότητα έναντι των κυττάρων MDCK παρά ανασταλτική επίδραση έναντι του ιού. Στο Διάγραμμα 4.2.2 παρουσιάζονται οι τιμές SI για τα δείγματα μελιού.



Διάγραμμα 4.2.2: Τιμές δείκτη επιλεκτικότητας (SI) των δειγμάτων μελιού κατά φθίνουσα σειρά.

Τα δείγματα μελιού που παρουσιάζονται στο διάγραμμα έχουν τιμή SI μεγαλύτερη της μονάδας (>1), γεγονός το οποίο σημαίνει πως η κυτταροτοξική συγκέντρωση 50% (CC_{50}) είναι μεγαλύτερη από την ανασταλτική συγκέντρωση 50% (IC_{50}). Επομένως τα συγκεκριμένα δείγματα μελιού αναστέλλουν κατά το ήμισυ τον τίτλο του ιού της γρίπης Α (H1N1) σε συγκέντρωση που δεν είναι ακόμα τοξική για το ήμισυ των κυττάρων MDCK. Η τιμή SI όσο μεγαλύτερη είναι, τόσο πιο επιλεκτικό είναι το δείγμα μελιού στην αναστολή του ιού. Η μεγαλύτερη τιμή SI επιτυγχάνεται όταν ένα δείγμα μελιού έχει μεγαλύτερη τιμή CC_{50} (δηλαδή μικρότερη κυτταροτοξικότητα) και μικρότερη τιμή IC_{50} (δηλαδή μεγαλύτερη ιική αναστολή).

Την μεγαλύτερη τιμή δείκτη επιλεκτικότητας είχε το μέλι από πεύκο Ρόδου (5) ακολουθούμενο από το πεύκο Θάσου (3,15). Τελευταίο στην κατάταξη του δείκτη επιλεκτικότητας έρχεται το δείγμα μελιού από πεύκο Ηρακλείου (2). Το δείγμα μελιού από Manuka βρίσκεται στην τρίτη θέση με πολύ μικρή διαφορά από το πεύκο Θάσου με τιμή SI 3.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το μέλι έχει περίοπτη θέση ως ιατρικό προϊόν από καταβολής κόσμου. Το μέλι έχει χρησιμοποιηθεί πολλάκις σε διάφορες κουλτούρες για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες, όπως ως φάρμακο για εγκαύματα, καταρράκτη, έλκη και επούλωση πληγών, απλώς και μόνο επειδή λειτουργεί ως καταπραϋντικό όταν αρχικά εφαρμόζεται σε ανοιχτές πληγές (Coulston, 2000).

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού είναι αναγνωρισμένη εδώ και πολλά χρόνια. Το μέλι έχει τραβήξει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας λόγω της αντιμικροβιακής του ιδιότητας ως εναλλακτική θεραπεία (Molan, 1992). Οι επιστημονικές μελέτες του παρελθόντος υποδεικνύουν την ύπαρξη αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης (Machado De-Melo et al., 2018; Burlando, 1978). Το μέλι συμβάλλει στην καλή λειτουργία και την υγεία του γαστρεντερικού συστήματος όπως επίσης βοηθάει και σε καρδιαγγειακές παθήσεις (Haffeejee & Moosa, 1985; Krell, 1996).

Στο παρελθόν έχουν υπάρξει πολλές *in vitro* μελέτες για την αντιμικροβιακή δράση του μελιού έναντι ενός πλήθους παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων. Στην αντι-ική του όμως δράση, δεν έχει δοθεί το ανάλογο βάρος από την επιστημονική κοινότητα τα προηγούμενα χρόνια. Μελέτες για την αντι-ική δράση του μελιού έχουν αναφέρει ενθαρρυντικά αποτελέσματα έναντι του ιού του απλού έρπητα και του ιού της Ερυθράς (Rubella) (Al-Waili, 2004; Zeina et al., 1996). Άλλη μια μελέτη έδειξε μείωση των ιικών πλακών μετά από προσθήκη μελιών Manuka και τριφυλλιού σε μολυσμένα από ιό έρπητα ζωστήρα ανθρώπινα κύτταρα κακοήθους μελανώματος (human malignant melanoma cells, MeWo) (Shahzad & Cohrs, 2012). Επιπρόσθετα, αντίστοιχη μελέτη με τη δική μας, εξέτασε την αντι-ική δράση διάφορων μελιών έναντι του ιού της γρίπης Α, χρησιμοποιώντας μία πρότυπη κυτταρική σειρά νεφρών σκύλου (Madin-Darby canine kidney cell line, MDCK). Το μέλι Manuka που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη παρουσίασε μία ισχυρή αντι-ική δυναμική έναντι του ιού της γρίπης Α (H1N1) (Watanabe et al., 2014).

Στην παρούσα εργασία είχαμε δεκατρία (13) διαφορετικά δείγματα μελιού όπου τα 12 ήταν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και το δέκατο τρίτο ήταν το μέλι Manuka της Νέας Ζηλανδίας με δείκτη UMF24+ (από τις υψηλότερες τιμές διαθέσιμες στην αγορά). Τα δείγματα αυτά εξετάστηκαν ως προς την τοξικότητα τους έναντι της κυτταρικής σειράς Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) καθώς και ως προς την δραστικότητα τους έναντι του ιού της γρίπης Α (H1N1).

Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας του κάθε μελιού, σε μία σειρά της πλάκας προστίθεντο το συγκεκριμένο δείγμα μελιού αραιωμένο σε θρεπτικό MEM σε διάφορες συγκεντρώσεις (πεντάδα πηγαδιών ανά μέλι ανά συγκέντρωση). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 και 1 mg/mL.

Η κυτταροτοξικότητα καταγράφηκε μέσω του υπολογισμού της τιμής CC_{50} (Cytotoxic Concentration 50%), η οποία χρησιμοποιείται ως μέτρο για την έκφραση του επιπέδου τοξικότητας. Η τιμή CC_{50} υπολογίσθηκε με τη μέθοδο MTT (Denizot & Lang, 1986; Hansen, Nielsen, & Berg, 1989; Mossmann, 1983).

Όλα τα δείγματα μελιού εμφανίζουν μεγάλη τοξικότητα έναντι των κυττάρων MDCK και προκαλούν ολική καταστροφή όταν είναι σε συγκεντρώσεις 128, 64 και 32 mg/mL. Η επίδραση αυτή έχει προταθεί ότι μπορεί να οφείλεται στο χαμηλό pH και την υψηλή οσμωτικότητα του μελιού (Minden-Birkenmaier & Bowlin, 2018). Με βάση τις τιμές CC_{50} που πήραμε το Θυμαρίσιο μέλι Καλύμνου εμφανίζει την μεγαλύτερη τοξικότητα έναντι των κυττάρων MDCK με CC_{50} 1,24 mg/mL. Την τελευταία θέση όσο αναφορά την τοξικότητα έναντι των κυττάρων MDCK κατέλαβε το μέλι από Θυμαρί Χανίων καθώς είχε την μεγαλύτερη τιμή CC_{50} με 30,5 mg/mL. Το μέλι Manuka κατέλαβε την προτελευταία θέση στην κατάταξη της τοξικότητας με τιμή CC_{50} 24 mg/mL. Στα υπόλοιπα δείγματα μελιού οι τιμές CC_{50} κυμάνθηκαν από 3,5 έως 19 mg/mL.

Σε μια αντίστοιχη μελέτη ελέγχθηκαν 12 διαφορετικά είδη μελιών από την Παλαιστίνη και το Μαρόκο ως προς την τοξικότητα τους έναντι ανθρωπίνων κυτταρικών σειρών καρκινώματος του μαστού και εντερικού καρκινώματος σε διάφορες συγκεντρώσεις 0 - 2000 µg/mL. Τα αποτελέσματα της τοξικότητας διέφεραν αρκετά μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών. Η τοξικότητα βρέθηκε μικρότερη σε κύτταρα καρκινώματος του μαστού σε σχέση με κύτταρα εντερικού καρκινώματος σε συγκέντρωση μελιών 2000 µg/mL. Επίσης εντοπίστηκαν διαφορές ως προς ορισμένα φαινορικά συστατικά στη σύσταση μεταξύ των δειγμάτων μελιού. Οι διαφορές αυτές πιθανώς οφείλονται στη διαφορετική βοτανική προέλευση των μελιών και στις κλιματικές και εδαφικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή όπου εδρεύουν τα μελίσσια. Η συγκεκριμένη μελέτη τονίζει τις διαφορές τοξικότητας που μπορεί να εμφανίζει ένα είδος μελιού σε δυο διαφορετικές κυτταρικές σειρές ή δύο διαφορετικά είδη μελιού στην ίδια κυτταρική σειρά. Στην πρώτη περίπτωση η διαφορά τοξικότητας μπορεί να οφείλεται στην διαφορετική επίδραση των συστατικών ενός είδος μελιού, ενώ στην δεύτερη περίπτωση οι ποσότητες των

συστατικών του κάθε είδους μελιού είναι η αιτία για τις διαφορές στην τοξικότητα (Imtara et al., 2019).

Στην παρούσα εργασία, οι διαφορές της τοξικότητας των μελιών στα κύτταρα MDCK μπορεί να εξηγηθεί από τις διαφορές στην σύσταση μεταξύ των δειγμάτων μελιού.

Μία παρόμοια μελέτη με την δικιά μας όπου εξετάστηκε η κυτταροτοξικότητα και η αντι-ική δράση δειγμάτων μελιού έναντι του ιού της γρίπης Α σε πρότυπη κυτταρική σειρά MDCK (Madin-Darby canine kidney cell line), δεν υπήρξαν ιδιαίτερες διαφορές στις τιμές CC_{50} . Τα διάφορα είδη μελιού συμπεριλαμβανομένου και του μελιού Manuka παρουσίασαν τιμές CC_{50} που κυμαίνονταν κοντά στα 81 mg/ml (Watanabe et al., 2014). Οι τιμές αυτές είναι σαφώς μεγαλύτερες από τις τιμές της παρούσας εργασίας καθώς το μέλι Manuka που χρησιμοποιήθηκε σε εκείνη την εργασία είχε UMF 15+, πράγμα το οποίο υποδεικνύει διαφορά στην σύσταση σε σχέση με το δικό μας μέλι Manuka (UMF 24+), δικαιολογώντας έτσι, τη διαφορά στις τιμές τοξικότητας

Οι τιμές IC_{50} που προέκυψαν από τα αποτελέσματα της Real-Time PCR και τη χρήση της συγκριτικής μεθόδου Ct επιβεβαίωσαν όσα παρατηρήσαμε στο ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο, πιο συγκεκριμένα παρατηρήσαμε πως κάποια δείγματα μελιού της παρούσας εργασίας δεν εμφάνισαν αντι-ική δράση έναντι του ιού H1N1. Συγκεκριμένα τα μέλια από βαμβάκι Λάρισας, θυμάρι Χανίων, θυμάρι Καλύμνου, θυμάρι Κεφαλλονιάς, καστανιά Αγίου Όρους και πεύκο Χαλκιδικής δεν είχαν τιμές IC_{50} .

Από τα δείγματα μελιού που είχαν τιμή IC_{50} , την μεγαλύτερη τιμή είχε το μέλι από έλατο Κορινθίας (23 mg/ml), επομένως εμφανίζει την μικρότερη αντι-ική δράση έναντι του ιού της γρίπης Α (H1N1), με ακόλουθο το μέλι από θυμάρι Χίου (15,8 mg/ml). Την μικρότερη τιμή IC_{50} είχε το μέλι από πεύκο Ρόδου (1,57 mg/ml) και άρα την αποτελεσματικότερη ιική αναστολή σε σχέση με όλα τα δείγματα, με αμέσως επόμενο το μέλι από πεύκο Θάσου (3,16 mg/ml). Το δείγμα από μέλι Manuka της παρούσας μελέτης ήταν στη μέση της κατάταξης IC_{50} (8 mg/ml).

Στο παρελθόν μία αντίστοιχη έρευνα με τη δική μας, εξέτασε την αντι-ική δράση δειγμάτων μελιού έναντι του ιού της γρίπης Α σε πρότυπη κυτταρική σειρά MDCK. Σε αντίθεση με τη δική μας εργασία, οι ερευνητές βρήκαν πως όλα τα μέλια που ελέγχθηκαν παρουσίασαν αντι-ική δράση έναντι του ιού της γρίπης Α. Το μέλι Manuka στη συγκεκριμένη μελέτη εμφάνισε τη μεγαλύτερη αντι-ική δράση με τιμή

IC₅₀ περίπου 3,6 mg/ml, σε αντίθεση με το δικό μας δείγμα από μέλι Manuka που εμφάνισε τιμή IC₅₀ 8 mg/ml (Watanabe et al., 2014). Ακόμα μία έρευνα έδειξε μείωση των ιικών πλακών ιού έρπητα ζωστήρα μετά από προσθήκη μελιών Manuka και τριφυλλίου σε συγκεντρώσεις 0 - 6% wt/vol σε ανθρώπινα κύτταρα κακοήθους μελανώματος (human malignant melanoma cells, MeWo) (Shahzad & Cohrs, 2012).

Η τιμή SI για ένα δείγμα μελιού είναι πολύ σημαντική, καθώς όσο υψηλότερη είναι, τόσο πιο αποτελεσματικό είναι έναντι του ιού που εξετάζεται και παράλληλα πιο ασφαλές για τα κύτταρα (Cavalli et al., 2012). Για κάθε δείγμα μελιού η τιμή του δείκτη επιλεκτικότητας (Selectivity index, SI) υπολογίζεται από την διαίρεση της τιμής CC₅₀ του δείγματος προς την αντίστοιχη τιμή IC₅₀. Από τα μέλια που είχαν τιμή IC₅₀, τα μέλια από έλατο Κορινθίας, θυμάρι Χίου και ερείκη Άνδρου είχαν τιμές SI μικρότερες της μονάδας (<1) με συνέπεια να εμφανίζουν μεγαλύτερη τοξικότητα έναντι των κυττάρων MDCK παρά ανασταλτική επίδραση έναντι του ιού. Την μεγαλύτερη τιμή SI είχε το δείγμα μελιού από πεύκο Ρόδου (5) με ακόλουθο το πεύκο Θάσου (3,15). Με πολύ μικρή διαφορά από το πευκόμελο Θάσου ήταν το μέλι Manuka (3) που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη μας και τελευταίο στην κατάταξη του δείκτη επιλεκτικότητας (SI) ήταν το δείγμα μελιού από πεύκο Ηρακλείου (2).

Στην αντίστοιχη έρευνα που προαναφέραμε και πραγματοποιήθηκε το 2014 οι τιμές SI που είχαν κυμαίνονταν από 22,9 έως 7,1, με το μέλι Manuka να έχει την μεγαλύτερη τιμή (Watanabe et al., 2014). Οι τιμές αυτές σε σχέση με τις τιμές της παρούσας μελέτης είναι πολύ υψηλότερες καθώς στην μελέτη αυτή, τα δείγματα μελιού που χρησιμοποίησαν συμπεριλαμβανομένου του Manuka είχαν τιμές CC₅₀ πολύ μεγαλύτερες από τις δικιές μας όπως αναφέραμε παραπάνω. Επίσης σε εκείνη την έρευνα ακολουθήθηκε διαφορετική μεθοδολογία για την ανάδειξη της αντι-ιικής δράσης των μελιών έναντι του ιού της γρίπης Α, σε σχέση με τη δική μας μεθοδολογική προσέγγιση, προσθέτοντας έτσι, ακόμα μία αιτία για τη διαφορά των αποτελεσμάτων πέραν της τοξικότητας.

Κάνοντας μία ανακεφαλαίωση, συμπεραίνουμε ότι από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει πως όλα τα δείγματα μελιού που εξετάστηκαν αραιωμένα με θρεπτικό μέσο MEM, εμφανίζουν μεγάλη τοξικότητα έναντι των κυττάρων MDCK όταν είναι σε συγκεντρώσεις 128, 64 και 32 mg/ml. Επίσης μπορούμε να συμπεράνουμε πως δεν εμφανίζουν όλα τα εξεταζόμενα ελληνικά δείγματα μελιού αντι-ιική δυναμική έναντι του ιού της γρίπης Α (H1N1), ενώ η αντι-ιική δράση του μελιού Manuka έναντι του ιού H1N1, επιβεβαιώθηκε εκ νέου και στην

παρούσα μελέτη. Τη χρονική περίοδο της συγγραφής της παρούσας εργασίας, απ' όσο είναι γνωστό, δεν υπάρχουν δημοσιευμένες παρόμοιες μελέτες που να εξετάζουν ελληνικά μέλια ως προς την αντι-ική τους επίδραση έναντι του ιού της γρίπης Α (H1N1), όπως και την τοξικότητά τους έναντι της κυτταρικής σειράς MDCK.

Συνολικά, τα 4 πιο αποτελεσματικά μέλια έναντι του ιού της γρίπης Α (H1N1) είναι το μέλι από πεύκο Ρόδου, πεύκο Θάσου, Manuka και πεύκο Ηρακλείου, τα οποία είναι και παράλληλα ασφαλή για τα κύτταρα MDCK. Όλα αυτά τα αποτελέσματα καθιστούν σαφείς τις μοναδικές ιδιότητες κάποιων ελληνικών μελιών τα οποία συναγωνίζονται το μέλι Manuka για το θέμα της ασφάλειά τους ως προς τα κύτταρα αλλά και ως προς την ανασταλτική τους επίδραση έναντι του συγκεκριμένου ικού στελέχους γρίπης που εξετάστηκε. Η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη των ελληνικών μελιών χρησιμοποιώντας διαφορετικές κυτταρικές σειρές, αλλά και διαφορετικά ιικά στελέχη κρίνεται απαραίτητη για την ανάδειξη όλων των μοναδικών ιδιοτήτων των ελληνικών μελιών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Abdullah, A. A., & Clemencia, Al. (2009). Effect of Natural Honey (Produced by African sculata in Guyana) against Bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) and Fungus (*Candida albicans*). *Word Journal of Dairy & Food Sciences*, 4, (1): 73-33.
- Accorti, M., Persano-Oddo, L., Piazza, MG., & Sabatini, AG. (1986). Schede di caratterizzazione della principali qualità di miele italiano. *Apicoltura 2*, appendix, 36 pp.
- Adams, C. J., Boulton, C. H., Deadman, B. J., Farr, J. M., Grainger, M. N., Manley-Harris, M., & Snow, M. J. (2008). Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate research*, 343(4), 651–659.
- Ahmed, S., Sulaiman, S. A., Baig, A. A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., ... Othman, N. H. (2018). Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 8367846.
- Ajibola, A., Chamunorwa, J. P., & Erlwanger, K. H. (2012). Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition & metabolism*, 9, 61.
- Ajibola, A., Chamunorwa, J. P., & Erlwanger, K. H. (2012). Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition & metabolism*, 9, 61.
- Alissandrakis, E., Kibaris, A., Tarantilis, P., Harizanis, P., & Polissiou, M. (2005). Flavor compounds of Greek cotton honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1444 - 1452.
- Allen, K. L., Molan, P. C., & Reid, G.M. (1991). A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43: 817–822.
- Alvarez-Suarez, J. M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., & Giampieri, F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods* (Basel, Switzerland), 3(3), 420–432.

- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M., (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: a review, *Mediterr J Nutr Metab*, 3:15–23.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food chemistry*, Volume 63, Issue 4, Pages 549-562.
- Aparna, A.R. & Rajalakshmi, D. (1999). Honey—its characteristics, sensory aspects, and applications. *Food Reviews International*, 15(4), 455-471.
- Bosi, G., & Battaglini, M. (1978). Gas Chromatographic Analysis of Free and Protein Amino Acids in Some Unifloral Honeys. *Journal of Apicultural Research*, 17(3), 152–166.
- Burlando, F. (1978). Sull'azione terapeutica del miele nelle ustioni. *Minerva Dermatol*, 113:699-706.
- Carter, D. A., Blair, S. E., Cokcetin, N. N., Bouzo, D., Brooks, P., Schothauer, R., & Harry, E. J. (2016). Therapeutic Manuka Honey: No Longer So Alternative. *Frontiers in microbiology*, 7, 569.
- Casas, I., Powell, L., Klapper, P. E., & Cleator, G. M. (1995). New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods*, 53(1), 25-36.
- Cavalli, R., Donalisio, M., Bisazza, A., Civra, A., Ranucci, E., Ferruti, P., & Lembo, D. (2012). Enhanced Antiviral Activity of Acyclovir Loaded into Nanoparticles. *Methods in Enzymology*, 509, 1-19.
- Chatzopoulou, F., Gioula, G., Kioumis, I., Chatzidimitriou, D., & Exindari, M. (2018). Identification of complement-related host genetic risk factors associated with influenza A (H1N1) pdm09 outcome: challenges ahead. *Medical Microbiology and Immunology*, 208: 631–640.
- Chen, C. (2019). Relationship between Water Activity and Moisture Content in Floral Honey. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(1), 30.
- Cooper, R., Molan, P. & Harding, K. (2002). The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 857-863.
- Coulston, AM. (2000). Honey...how sweet it is! *Nutr Today*, (35):96–100.

- Crane, E. (1990). The traditional hive products: honey and beeswax. *In: Bees and Beekeeping (Ed. By E. Crane)*, Chapter 13, pp: 388-451.
- Crane, E. (1979). Honey: A comprehensive survey. *International Bee Research Association (IBRA)*, Heinemann, London.
- Crane, E. (1999). The World History of Beekeeping and Honey Hunting. New York, USA: *Routledge*, p.21.
- Crane, E. (2013). The archaeology of beekeeping, *Gerald Duckworth & Co. Ltd.* London, p. 4.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 89(2), 271-277.
- Dibner, J. J., & Buttin, P. (2002). Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism¹. *The Journal of Applied Poultry Research*, 11(4), 453–463.
- Eisfeld, A. J., Neumann, G., & Kawaoka, Y. (2014). Influenza A virus isolation, culture and identification. *Nat Protoc*, 9(11), 2663-2681.
- Eleftheriou, E., Tsiripidis, I., & Karabournioti, S. (2009). Melissopalynological attributes of some Greek thyme honeys. *Journal of Apicultural Research*, 48(2), 104-114.
- Erejuwa O. O., Sulaiman, S. A., & Wahab, M. S. (2012). Honey: anovel antioxidant. *Molecules*, vol. 17, no. 4, pp. 4400–4423.
- Eteraf-Oskouei, T., & Najafi, M. (2013). Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. *Iranian journal of basic medical sciences*, 16(6), 731–742.
- Fodor, E. (2013). The RNA polymerase of influenza a virus: mechanisms of viral transcription and replication. *Acta Virol*, 57(2):113-22.
- Haffjee, I. E., & Moosa, A. (1985). Honey in the treatment of infantile gastroenteritis. *British Medical Journal*, 290: 1866-1867.
- Halliwell, B. (2005). Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E., & Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, 119(2), 203-210.

- Hashem-Dabaghian, F., Agah, S., Taghavi-Shirazi, M., & Ghobadi, A. (2016). Combination of *Nigella sativa* and Honey in Eradication of Gastric *Helicobacter pylori* Infection. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 18(11).
- Hassan, M. I., Mabrouk, G. M., Shehata, H. H., & Aboelhussein, M. M. (2010). Antineoplastic Effects of Bee Honey and *Nigella sativa* on Hepatocellular Carcinoma Cells. *Integrative Cancer Therapies*, 11(4), 354–363.
- Hay, A.J., Gregory, V., Douglas, A.R., & Lin, Y.P. (2001). The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356(1416):1861-70.
- Hermosín, I., Chicón, R. M., & Dolores Cabezudo, M. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83(2), 263–268.
- Imtara, H., Kmail, A., Touzani, S., Khader, M., Hamarshi, H., Saad, B., & Lyoussi, B. (2019). Chemical Analysis and Cytotoxic and Cytostatic Effects of Twelve Honey Samples Collected from Different Regions in Morocco and Palestine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019(87).
- Johnston, M., McBride, M., Dahiya, D., Owusu-Apenten, R., & Nigam, P. S. (2018). Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview. *AIMS microbiology*, 4(4), 655–664.
- Kourti, A., Spanakos, G., Politi, L., Stavropoulou, A., Spanakis, N., & Tsakris, A. (2012). Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) 2009 virus in Greece during the post-pandemic 2010–2011 season. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(1), 72–74.
- Krell, R. (1996). Value-added Products from Beekeeping. FAO Agricultural Services Bull, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, N.124.
- Kwakman, P. H. S., & Zaat, S. A. J. (2011). Antibacterial components of honey. *IUBMB Life*, 64(1), 48–55.
- Kwakman, P., te Velde, A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. & Zaat, S. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, 24 (7), 2576-2582.
- London-Allsop, K.A., & Miller, J.B. (1996). Honey revisited: a reappraisal of honey in pre-industrial diets. *Br J Nutr*, (75):513–520.

- Machado De-Melo, A.A., Almeida-Muradian, L.B., Sancho, M.T., & Pascual-Maté, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5-37.
- Maldonado, J., Van Reeth, K., Riera, P., Sitja, M., Saubi, N., & Espuna, E. (2006). Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. *Vet J*, 172(2):377-81.
- Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 1(2), 154–160.
- Manikis, I., & Thrasivoulou, A. (2001). The relation of physicochemical characteristics of honey and the crystallization sensitive parameters. *Apiacta*, XXXVI (3):106-112.
- Manyi-Loh, C. E., Ndip, R. N., & Clarke, A. M. (2011). Volatile compounds in honey: a review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. *International journal of molecular sciences*, 12(12), 9514–9532.
- Minden-Birkenmaier, B. A., & Bowlin, G. L. (2018). Honey-Based Templates in Wound Healing and Tissue Engineering. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 5(2), 46.
- Molan, P. (1992). The antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World*, 73(2), 59-76.
- Mossmann, P. B. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 49-53.
- Mundo, M., Padilla-Zakour, O., & Worobo, R. (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*, 97 (1), 1-8.
- Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., & Ola, I. O. (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African health sciences*, 7(3), 159–165.
- Olsen, CW. (2002). The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res*, 85(2):199-210.

- Potter, C.W. (2004). Influenza in Principle and Practice of Clinical Virology, 5th edn (eds Zuckerman A.J., Banatvala J.E., Pattison J.R., Griffiths P.D., Schoub B.D.). *John Wiley & sons Ltd*, Sassex, pp 271-297.
- Samarghandian, S., Farkhondeh, T., & Samini, F. (2017). Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Pharmacognosy research*, 9(2), 121–127.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 215S–217S.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). *Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108.
- Shahzad, A., & Cohrs, R. J. (2012). In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicine study for potential remedy for shingles. *Translational biomedicine*, 3(2), 2.
- Shahzad, A., & Cohrs, R. J. (2012). In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicine study for potential remedy for shingles. *Translational biomedicine*, 3(2), 2.
- Shuel, R. W. (1975). The production of nectar. In C. P. Dadant (Ed.), *The hive and the honeybee*. Illinois: Hamilton, pp. 265–282.
- Süntar, I. P., Akkol, E. K., Yilmazer, D., Baykal, T., Kırmızıbekmez, H., Alper, M., & Yeşilada, E. (2010). Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2), 468–477.
- Thrasyvoulou, A., & Manikis, I. (1995). Some physico-chemical and microscopical characteristics of Greek unifloral honeys. *Apidologie*, 26(6):441-452.
- Tomás-Berberán, F. A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B. S. & Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81:485-496.
- Wang, R., Starkey, M., Hazan, R. & Rahme, L. (2012). Honey's ability to counter bacterial infections arises from both bactericidal compounds and QS inhibition. *Frontiers in Microbiology*, 3(144), 1-8.

- Watanabe, K., Rahmasari, R., Matsunaga, A., Haruyama, T., & Kobayashi, N. (2014). Anti-influenza Viral Effects of Honey In Vitro: Potent High Activity of Manuka Honey. *Archives of Medical Research*, 45(5), 359–365.
- Weston, R. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*, 71 (2), 235-239.
- Zeina, B., Othman, O., & AL-Assad, S. (1996). Effect of honey versus thyme on Rubella virus survival in vitro. *J Altern Complement Med*, 2:345-348.
- Zhou, NN., Senne, DA., Landgraf, JS., Swenson, SL., Erickson, G., & Rossow, K. (1999). Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *J Virol*, 73(10):8851-6.
- Al-Waili, NS. (2004). Topical honey application vs. acyclovir for the treatment of recurrent herpes simplex lesions. *Med Sci Monit*, 10: MT94-MT98.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Αντωνιάδης, Α., Αντωνιάδης, Γ., Λεγάκης, Ν., & Τσελέντης, Ι. (1999). Ιατρική Μικροβιολογία. *Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη*, Αθήνα, 360-367.
- Δερματόπουλος, Β. (1949). Βασικές γνώσεις σύγχρονης μελισσοκομίας. *Έκδοση Μελισσοκομικού Συνεταιρισμού Θεσσαλονίκης*, σελ. 40-41.
- Θρασυβούλου, Α. (2001). Πρακτική Μελισσοκομία- Προβλήματα, αιτίες και λύσεις. Θεσσαλονίκη, σελ. 147-156, 171.
- Θρασυβούλου, Α., & Μανίκης, Ι. (1990). Κατηγορίες Ελληνικού Μελιού 4(6) : 158-163.
- Θρασυβούλου, Α., Μανίκης, Ι., Τανανάκη, Χ., Τσέλλιος, Καραμπουρνιώτη, Σ., & Δήμου, Μ. (2002). Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος. *1ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας*, Αθήνα, 29 Νοεμβρίου–1 Δεκεμβρίου 2002
- Μπίκος Θ., (1991). Όλα για το μέλι. *Έκδοση του ιδίου*. σελ. 263-270.
- Πίκουλας, Ε. (1986). Τεχνολογία γλυκαντικών υλών. Αθήνα, σελ. 61-65.
- Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης. (2001). Οδηγία 2001/110/ΕΚ του Συμβουλίου, της 20ής Δεκεμβρίου 2001, για το μέλι.

- Τσακρής, Α. (2009). Εισαγωγή στη Μικροβιολογία. Gerard J. Tortura, Berdell R. Funke, Christine L. Case. *Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης*, Αθήνα, 494-495, 877-880.
- Χαριζάνης, Π. Χ. (1996). Μέλισσα και μελισσοκομική τεχνική. *Β' Έκδοση του ιδίου*, Θεσ/νίκη, σελ 263.

Πηγές εικόνων

- **Εικόνα 2.2:** Kmecl, P., Figelj, J., & Tout, T. P. (2014). The birds of dry meadows above the Karst edge. *University of Primorska, Koper*, 5:46-63.
- **Εικόνα 1.5:** Clearwater, M. J., Revell, M., Noe, S., & Manley-Harris, M. (2018). Influence of genotype, floral stage, and water stress on floral nectar yield and composition of mānuka (*Leptospermum scoparium*). *Annals of Botany*, 121(3), 501–512.
- **Εικόνα 1.6.2:** Alvarez-Suarez, J. M., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., & Giampieri, F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods* (Basel, Switzerland), 3(3), 420–432.
- **Εικόνα 1.8.1, Εικόνα 1.8.2:** Medina, RA. & Garcia-Sastre, A. (2011). Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol*, 9(8):590-603.